

La influencia de *Wolbachia* en la zona híbrida de *Chorthippus parallelus* del Valle de Tena (Pirineos)

Mario Zabal Aguirre



**Tesis doctoral
Universidad Autónoma de Madrid
Junio de 2015**

Esta investigación ha sido financiada mediante la concesión de la beca FPI BES-2003-2261 y los proyectos BOS2002-00232, CGL2005-02898/BOS, CGL2009-08380/BOS y CGL2012-35007 del Programa Nacional de Proyectos de Investigación de I+D+I.

Así mismo, queremos agradecer al Gobierno de la Comunidad de Madrid, a la Junta de Andalucía, al Gobierno de Aragón y a las autoridades del Parc Pyrénées de Francia por la concesión de los permisos necesarios para la captura de los especímenes requeridos para realizar este trabajo. También quiero agradecer al Ayuntamiento de Sallent de Gállego por poner a nuestra disposición un lugar adecuado para realizar los cruzamientos.

A mi familia,
y a aquellos que ya no están,
pero que reconozco cada vez que me miro en el espejo.

Agradecimientos

Quisiera agradecer a todo el mundo que, de una forma u otra, ha contribuido a la realización de este trabajo y a enriquecerlo, tanto profesional como personalmente. Ha sido un largo y duro camino, pero sobre todo largo. En todo este tiempo la lista ha ido aumentando e incluye: al menos una universidad, la Universidad Autónoma de Madrid; y dos centros de investigación, el Centro de Investigación Forestal del INIA y el Instituto de Ciencias Agrarias del CSIC.

La universidad me vio nacer y, gracias a personas como Maricarmentxo y Pepe, dar los primeros pasos (y alguno más) en esto de la ciencia. Mientras fui creciendo me curtieron personalidades inclasificables como Jaime y Carlos, ellos son los que me pusieron en la mano un saltamontes por primera vez. Encontré a personas con quien comparto muchos puntos de vista, como Joakina, y personas que me han supuesto una inmensa ayuda como Paki. Muchas son las horas de conversación durante las comidas, aunque siempre acabamos igual, Rosa y yo hablando de política. Crecí junto a otros compañeros como Miguel, María, Jonás y Paloma, compartiendo aventuras y desventuras. Y no me olvido de Pepe Martín y Begoña, que ayudaron en lo que pudieron. A todos ellos gracias porque han sido el núcleo duro de esta tesis.

Pero volé, y aterricé en el INIA. Y me encontré con gente que me enseñó otras formas de hacer ciencia. Supongo que maduré. Gracias a Santi, a Delphine, a Ricardo, a Myriam, a Katha, a Gregor, a Isa, a Luís, a Carmen y un largo etcétera, porque me abristeis a un mundo nuevo enriqueciéndome enormemente.

Y seguí volando, y llegué al CSIC donde encontré también buena gente. He tenido el gusto de conocer a personas como Leticia, Irene, Francesca, Vanesa, Carlos o Victoria que me han quitado 10 años de encima. Ana, JJ, las Mercedes y el gran Teo me han enseñado mundos más lejanos aún, enriqueciéndome más y más. Y no me puedo olvidar de Lola y de Bea, esas grandes compañeras que te hacen el día más llevadero.

Pero hay gente que siempre ha estado ahí, que nacieron conmigo y que siguen a mi lado, y por las que no puedo nada más que estar agradecido y sentirme afortunado. Ellos saben quiénes son y lo importante que son para mí. Y espero tenerles para el resto de mi vida porque sin ellos todo se hace más duro y sin su apoyo esta tesis no se hubiera

finalizado. Son grandes personalidades, caracteres sin complejos, sensibilidades extraordinarias y con muchísima empatía. En definitiva, gente importante.

A todos, gracias de nuevo.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
RESUMEN	3
INTRODUCCIÓN	5

ESPECIE, ESPECIACIÓN Y ZONAS HÍBRIDAS.

<u>1.1 Concepto de especie</u>	5
<u>1.2 Barreras de aislamiento reproductivo</u>	7
<u>1.3 Especiación: tipos y desarrollo del proceso</u>	11
<u>1.4 Zonas híbridas</u>	14

CHORTHIPPUS PARALLELUS.

<u>2.1 Breve descripción de la especie</u>	18
<u>2.2 <i>C. parallelus</i>: diferenciación durante el Cuaternario y filogeografía</u>	18
<u>2.3 La zona híbrida de <i>C. parallelus</i> en Pirineos</u>	23
<u>2.4 Rasgos diferenciales y clinas en la zona híbrida</u>	26

WOLBACHIA COMO AGENTE EVOLUTIVO.

<u>3.1 Breve descripción del género</u>	30
<u>3.2 Alteraciones producidas por <i>Wolbachia</i> e implicaciones evolutivas</u>	30
<u>3.3 Modelos de la dinámica de la infección por <i>Wolbachia</i></u>	32
<u>3.4 <i>Wolbachia</i> y <i>C. parallelus</i></u>	34

OBJETIVOS	37
------------------------	----

MATERIAL Y MÉTODOS	39
---------------------------------	----

<u>4.1 Poblaciones muestreadas para el estudio de la infección por <i>Wolbachia</i></u>	39
<u>4.2 Preparación del material y extracción del ADN</u>	41
<u>4.3 Caracterización de <i>Wolbachia</i> mediante PCR, secuenciación y análisis filogenético</u>	42

<u>4.4 Discriminación entre los distintos tipos de infección mediante PCR.....</u>	<u>45</u>
<u>4.5 Análisis estadísticos realizados para el estudio de la distribución de la infección....</u>	<u>46</u>
<u>4.6 Diseño de los cruzamientos establecidos para determinar los efectos de</u> <u><i>Wolbachia</i>.....</u>	<u>48</u>
<u>4.7 Análisis estadísticos realizados con los cruzamientos establecidos.....</u>	<u>50</u>
<u>4.8 Modelo de la dinámica de la infección por <i>Wolbachia</i> en <i>C. parallelus</i>.....</u>	<u>52</u>
<u>4.9 Simulaciones de la dinámica de la infección por <i>Wolbachia</i> en <i>C. parallelus</i>.....</u>	<u>54</u>

RESULTADOS.....57

DESCRIPCIÓN DE LA INFECCIÓN.

<u>5.1 Cepas de <i>Wolbachia</i> detectadas en <i>C. parallelus</i>.....</u>	<u>57</u>
<u>5.2 La infección de <i>Wolbachia</i> en las poblaciones estudiadas.....</u>	<u>59</u>
<u>5.3 Patrones de infección en <i>C. parallelus</i>.....</u>	<u>63</u>
<u>5.4 Distribución de la infección en un transecto de la zona híbrida.....</u>	<u>72</u>

EFFECTOS DE *WOLBACHIA* EN *C. PARALLELUS*.

<u>6.1 Caracterización de los cruzamientos establecidos.....</u>	<u>74</u>
<u>6.2 Efectos de <i>Wolbachia</i> en la reproducción de las hembras.....</u>	<u>76</u>
<u>6.3 Incompatibilidad citoplasmática inducida por <i>Wolbachia</i>.....</u>	<u>77</u>

DINÁMICA DE LA INFECCIÓN EN *C. PARALLELUS*.

<u>7.1 Parámetros inferidos a partir de los cruzamientos.....</u>	<u>81</u>
<u>7.2 La infección en el equilibrio.....</u>	<u>86</u>
<u>7.3 Simulación de la dinámica de la infección.....</u>	<u>87</u>

DISCUSIÓN.....91

<u>8.1 Diversidad encontrada en <i>Wolbachia</i>.....</u>	<u>91</u>
<u>8.2 Características de la infección en las poblaciones estudiadas.....</u>	<u>95</u>
<u>8.3 Diferencias en la infección entre <i>C. p. parallelus</i> y <i>C. p. erythropus</i>.....</u>	<u>97</u>
<u>8.4 Variación de la infección en el transecto estudiado.....</u>	<u>99</u>

<u>8.5 Efectos de <i>Wolbachia</i> sobre <i>C. parallelus</i></u>	103
---	-----

<u>8.6 Dinámica de la infección en <i>C. parallelus</i></u>	106
---	-----

CONCLUSIONES	109
---------------------------	-----

BIBLIOGRAFÍA	111
---------------------------	-----

ANEXOS:

ANEXO I. Frecuencias absolutas de infección.

ANEXO II. Publicaciones derivadas de este trabajo.

ABREVIATURAS

ADN: ácido desoxirribonucleico

CBE: concepto biológico de especie.

Cpp: *Chorthippus parallelus parallelus*.

Cpe: *Chorthippus parallelus erythropus*.

DM: Dobzhansky-Muller.

HCA: análisis jerárquico de conglomerados (en inglés: *Hierarchical Cluster Analysis*)

IC: incompatibilidad citoplasmática.

Ka: miles de años.

Ma: millones de años.

MRCA: ancestro común más reciente (en inglés: *Most Recent Common Ancestor*)

pb: pares de bases

PCR: reacción en cadena de la polimerasa (en inglés: *Polymerase Chain Reaction*)

rRNA: ácido ribonucleico ribosómico (en inglés: *ribosomal Ribonucleic Acid*)

SRP: sistema de reconocimiento de pareja.

UMG: último máximo glacial.

RESUMEN

Las zonas híbridas son lugares donde dos taxones, más o menos diferenciados genéticamente, se encuentran, aparean y producen descendencia híbrida con características intermedias. Son objeto de estudio debido a que constituyen “laboratorios naturales” donde se pueden estudiar los distintos factores implicados en los procesos de especiación y divergencia evolutiva.

Dos subespecies del saltamontes *Chorthippus parallelus*, *C. p. parallelus* y *C. p. erythropus*, forman una zona híbrida en Pirineos. Esta zona híbrida ha sido objeto de numerosos estudios, generando gran cantidad de literatura y describiéndose numerosos caracteres que diferencian a las subespecies. La filogeografía de la especie, el comportamiento de los distintos caracteres a lo largo de varios transectos de la zona híbrida y los resultados obtenidos en distintos tipos de cruzamientos, han servido para explicar su origen y mantenimiento.

Recientemente se ha detectado la presencia de infección por *Wolbachia* en *C. parallelus*. Esta bacteria pertenece al orden Rickettsiales dentro de la clase Alphaproteobacteria. Es un endosimbionte obligado presente en el citoplasma de numerosas especies de artrópodos y nematodos. Puede provocar alteraciones reproductivas en los organismos a los que infecta siendo considerada como un posible agente implicado en procesos de especiación.

Dichas alteraciones reproductivas podrían estar generando barreras de aislamiento reproductivo afectando a la dinámica y mantenimiento de la zona híbrida de *C. parallelus* en Pirineos. La caracterización de la infección por *Wolbachia*, los efectos de la infección sobre la reproducción de *C. parallelus* y la dinámica de la infección son claves fundamentales para determinar el papel de la bacteria en la zona híbrida.

Se ha detectado que varias cepas diferentes de *Wolbachia* están implicadas en la infección y que su incidencia difiere entre las dos subespecies. Esta situación ha permitido distinguir tres patrones de infección: dos de ellos caracterizan a *C. p. parallelus* y a *C. p. erythropus*, mientras que el tercero incluye a una de las poblaciones de la zona híbrida donde confluyen los otros dos.

El principal efecto detectado consiste en la reducción del número de descendientes producidos en determinados cruzamientos en los que los parentales presentan un estado de infección diferente. Los resultados obtenidos encajan con la existencia de incompatibilidad citoplasmática inducida por *Wolbachia*. Por otra parte, la bacteria no parece tener ningún efecto sobre la fecundidad de las hembras infectadas o, en todo caso, podría estar aumentándola en aquellas hembras que poseen ciertas cepas.

Las simulaciones de la dinámica de la infección muestran que la bacteria es capaz de provocar su rápida expansión en las poblaciones. Estos eventos podrían haber provocado la estructuración genética de dichas poblaciones. Dicha estructuración se puede relacionar con la aparición de barreras reproductivas que impiden el libre intercambio genético en la zona híbrida y, por tanto, el avance de determinados caracteres desde una subespecie a la otra.

INTRODUCCIÓN

ESPECIE, ESPECIACIÓN Y ZONAS HÍBRIDAS.

1.1 Concepto de especie.

El concepto de “especie” ha sido, y probablemente siga siendo, una de las ideas más discutidas en el ámbito de la Biología Evolutiva. Mediante la nominación de las distintas especies designamos grupos de organismos que se asemejan entre sí y se diferencian de otros grupos similares. Dos vertientes sustentan el debate del denominado “problema de la especie”. Como ya apuntó Mayr (1982), la cuestión fundamental en este debate es determinar si la diversidad que encontramos en la naturaleza se organiza en entidades discretas y objetivamente diferenciables a las que llamamos especies (“realismo”) o, por el contrario, si la variación existente se distribuye de forma más o menos continua siendo las especies agrupaciones arbitrarias de organismos (“nominalismo”). El propio Darwin parece dudar cuando afirma en su obra magna que el término especie es tan arbitrario como el término variedad o que las especies son combinaciones artificiales hechas por conveniencia al igual que los géneros (Darwin, 1859). Si se admite la arbitrariedad del concepto de especie el debate acaba aquí. Pero, en el caso de aceptar el término como algo real y objetivo, se plantea la segunda cuestión. Ésta aborda la definición de especie o, lo que es lo mismo, cuáles son aquellos criterios objetivos que delimitan a las especies (para una revisión general del estado actual del tema: Wheeler & Meier, 2000; Hey, 2001; Coyne & Orr, 2004; Claridge, 2010; Mishler, 2010).

Se han propuesto varias definiciones desde distintos puntos de vista de la ciencia y que ponen énfasis en distintos aspectos: morfológico, biológico, filogenético, etc. (Mayden, 1997; de Queiroz, 1998). Sin embargo, ninguna de las definiciones propuestas parece convencer del todo al conjunto de la comunidad científica. A partir de los trabajos de Theodosius Dobzhansky (1937) y Ernst Mayr (1942) el “concepto biológico de especie” (CBE) comienza a ganar un mayor número de adeptos. Según el CBE una especie está formada por un conjunto de “grupos de poblaciones naturales que pueden cruzarse entre sí real o potencialmente, y que están aislados reproductivamente de otros grupos” (Mayr, 1957). Así pues, se enfatiza en el papel del “aislamiento reproductivo” a la hora de determinar especies diferentes.

Si bien el CBE es el concepto de especie más extendido también es, probablemente, el más criticado o revisado incluso por sus más fervientes defensores (entre otros: Mayr, 1963, 1982, 1992; Wheeler & Meier, 2000; Wu, 2001; Coyne y Orr, 2004). Por otro lado, es un concepto de difícil aplicación en el caso de organismos partenogenéticos o con reproducción asexual. Tampoco encaja muy bien con la posibilidad de hibridación o cruzamiento entre especies como se ha descrito en animales y, sobre todo, en plantas (Mallet, 2005). En otros campos, como el de la Paleontología, donde se trabaja con el registro fósil, se utilizan de forma pragmática las discontinuidades morfológicas para establecer los límites de las especies (Benton & Pearson, 2001) y surge el problema de las “cronoespecies”. Ni qué decir tiene la dificultad de aplicar el CBE en el mundo procariota donde se dan con frecuencia fenómenos de difícil encaje, como la transferencia génica horizontal, pudiéndose observar intercambio de material genético incluso entre taxones evolutivamente alejados (Ereshefsky, 2010). Es por ello que un conjunto substancial de científicos aboga por aceptar como válidas distintas definiciones de especie dependiendo de las características del organismo estudiado y del objetivo del estudio (Coyne y Orr, 2004; Hey, 2006; de Queiroz, 2007). Esta visión “pluralista” es, a veces, presentada como una debilidad del propio concepto de especie como entidad real y objetiva. Sin embargo, un denominador común subyace a las definiciones de especie más representativas de la actualidad: la especie es considerada como un linaje o grupo relacionado por ascendencia que evoluciona independientemente de otros linajes.

Dentro de los organismos con reproducción puramente sexual, es evidente la aplicabilidad del CBE y el valor del aislamiento reproductivo a la hora de delimitar la mayoría de las especies establecidas (para una discusión del tema ver Coyne y Orr, 2004). La reproducción sexual, a través de la meiosis y de la recombinación que ocurre durante dicho proceso, permite el “flujo génico” o intercambio de genes que mantiene la cohesión de la especie. Por ejemplo, dentro de una especie biológica es posible observar rasgos diferenciales entre poblaciones distribuidas en distintas zonas geográficas. Estos grupos diferenciados se suelen describir como subespecies, variedades, razas, etc. Sin embargo, si entran en contacto e individuos procedentes de diferentes grupos se cruzan con éxito, surgirán individuos híbridos con características intermedias. Así pues, las discontinuidades tenderán a desaparecer según aumente el intercambio de genes y la especie se mantendrá como un grupo cohesionado. Si por el contrario, y a pesar de la

posibilidad de cruzamiento, no se produce dicho intercambio debido al aislamiento reproductivo, las diferencias serán persistentes manteniéndose los dos grupos como entidades evolutivamente separadas.

1.2 Barreras de aislamiento reproductivo.

Una de las ventajas del CBE que destacan algunos autores es que lleva implícito el propio proceso de “especiación” por el cual se originan nuevas especies y plantea el marco de estudio de dicho proceso (Coyne y Orr, 2004). Desde el punto de vista del CBE, la especiación requiere la aparición de “barreras reproductivas” que reduzcan el flujo génico entre los grupos divergentes y que eviten que las diferencias existentes se diluyan. Las barreras reproductivas mantendrán el aislamiento entre grupos permitiendo su diferenciación y separación en especies independientes al final del proceso. Para comprender la especiación es indispensable estudiar el origen, naturaleza, arquitectura, desarrollo, etc. de las barreras reproductivas, es decir, de todo aquello que impida o reduzca el flujo génico entre las especies incipientes.

Las barreras reproductivas pueden ser “intrínsecas” y tener una base genética inherente al organismo, o “extrínsecas” al estar provocadas por causas ajenas (barreras geográficas, parasitismo, depredación, etc.). Las barreras reproductivas extrínsecas al organismo tienen un papel crucial en el proceso de diferenciación y eventual especiación. De hecho, la especiación con ausencia de flujo génico debida a la existencia de barreras geográficas o ecológicas está considerada como la más frecuente. Sin embargo, el CBE no considerará a una especie como tal sin la adquisición de mecanismos de aislamiento reproductivo intrínsecos.

Las barreras intrínsecas de aislamiento reproductivo se pueden clasificar en función de cuando actúen:

- (i) Barreras de “aislamiento prezigótico previas al apareamiento”: aquí quedará incluido todo aquello que prevenga el encuentro entre macho y hembra procedentes de grupos divergentes. Son ejemplos de este tipo las diferencias en el comportamiento durante el cortejo que disminuyen la

atracción sexual, distinta época de apareamiento para cada grupo, preferencia por hábitats distintos, etc.

- (ii) Barreras de “aislamiento prezigótico tras el apareamiento”: en este caso el apareamiento se realiza con éxito pero no se llega a producir la fecundación, es decir, la formación del cigoto o fusión de gametos. Puede ser debida a causas que impidan la correcta transferencia de gametos durante la cópula, que exista competencia espermática favoreciéndose la fecundación del óvulo por el espermato de un macho del mismo grupo, etc.
- (iii) Barreras de “aislamiento postzigótico”: la fecundación se produce pero el desarrollo hasta la fase adulta de los individuos híbridos resultantes es inviable o, de ser alcanzada, los individuos muestran esterilidad. Esta esterilidad híbrida puede mostrarse en la F1 (descendientes de la primera generación), en la F2 o en los retrocruzamientos de los híbridos con los parentales.

Pero, la pregunta inmediata es: ¿cómo evolucionan los genomas para que se generen estas barreras intrínsecas de aislamiento reproductivo?

En las barreras reproductivas prezigóticas están implicados los genes que constituyen el llamado sistema de reconocimiento de pareja o SRP (Paterson, 1985). Debido a la importancia de los genes involucrados en el apareamiento y la fecundación para asegurar la continuidad de una población, se asume que el SRP se encuentra bajo selección estabilizadora, es decir, tendente a uniformizar. Sin embargo, las barreras reproductivas prezigóticas pueden surgir de dos formas:

- Cuando las poblaciones quedan aisladas geográficamente, la deriva genética, la adaptación a distintos ambientes o la selección sexual pueden hacer divergir a aquellos genes. En cada población tienden a evolucionar SRPs propios y, de esta manera, individuos procedentes de grupos divergentes no se reconocerán mutuamente cuando vuelvan a encontrarse.

- Por otro lado, cuando las poblaciones están en contacto, la selección natural puede favorecer la divergencia de los SRPs en determinadas circunstancias. En el caso de que exista aislamiento postzigótico, los híbridos resultantes del cruzamiento entre individuos de grupos divergentes mostrarán menor eficacia biológica. En dicho escenario, cualquier mecanismo nuevo que evite este tipo de cruzamientos será favorecido por la selección natural. Esto se debe a que las barreras reproductivas prezigóticas tienen un menor coste en esfuerzo reproductivo ya que evitan cruzamientos cuyo resultado no son los óptimos. Es lo que se ha denominado como “efecto Wallace” o, posteriormente, “reforzamiento” (del inglés, *reinforcement*) y puede tener un papel importante en la especiación (Wallace, 1889; Butlin, 1987, 1995; Coyne & Orr, 1997; Ortiz-Barrientos *et al.*, 2009).

La naturaleza de los genes implicados en las barreras postzigóticas puede ser muy diversa no quedando restringidos a ninguna función en concreto. Dos poblaciones pueden haber divergido fijando distintos alelos para un gen funcional. Al cruzarse individuos de estas dos poblaciones, puede ser que la combinación de alelos procedentes de estos grupos divergentes provoque un mal funcionamiento de dicho gen en el híbrido. En este escenario, los descendientes híbridos presentarán un menor valor adaptativo constituyéndose así una barrera de aislamiento postzigótico. Pero ¿cómo pueden llegar a fijarse estos alelos dentro de una población sin provocar la reducción del valor adaptativo de sus individuos? Durante el proceso de fijación, la selección natural actuará en contra de los individuos heterocigotos para el gen en cuestión oponiéndose a la expansión del nuevo alelo. Este problema es resuelto por el modelo Dobzhansky-Muller (Bateson, 1909; Dobzhansky, 1934, 1937; Muller, 1940, 1942).

Según la explicación más simple del modelo Dobzhansky-Muller (DM), los individuos del grupo ancestral poseerían dos genes con los alelos *AABB* en el caso de un organismo diploide. El proceso de divergencia puede dar lugar a dos poblaciones diferenciadas en dichos *loci* con una dotación *aaBB* y *AAbb*, respectivamente. Durante el proceso de fijación del alelo derivado *a* en la primera población, los individuos *AaBB* y *aaBB* son perfectamente viables y fértiles. Lo mismo ocurre en la segunda población con los individuos *AABb* y *AAbb*. Tras el proceso de fijación, los cruzamientos entre individuos de diferente grupo serían del tipo *aaBB* \times *AAbb* dando una descendencia *AaBb*. La incompatibilidad surgiría de la interacción de los alelos derivados *a* y *b*,

presentes ambos en la descendencia híbrida, provocando inviabilidad o esterilidad. Las incompatibilidades DM son el resultado del efecto negativo de relaciones epistáticas entre distintos *loci* cuyos alelos derivados (*a* y *b*, en el ejemplo anteriormente expuesto) no están coadaptados pues han evolucionado en fondos genéticos diferentes (*BB* y *AA*, respectivamente).

Respecto al aislamiento reproductivo postzigótico, un patrón que cumplen la mayoría de los animales con cromosomas sexuales diferenciados es la regla de Haldane. Este investigador observó que “cuando en la descendencia de dos razas diferentes de animales uno de los sexos está ausente, es raro o estéril, ese sexo es el heterocigoto” (Haldane, 1922). Al decir “heterocigoto”, Haldane se refería al sexo heterogamético (XY o ZW) que en algunos casos es el masculino (mamíferos, *Drosophila*, etc.) y en otros casos es el femenino (aves, lepidópteros, etc.). La regla, por tanto, no está ligada al sexo sino a los cromosomas sexuales. Otro hecho importante es que la regla de Haldane se cumple en etapas tempranas en la evolución del aislamiento reproductivo postzigótico. Es decir, la inviabilidad o esterilidad del sexo heterogamético aparece con anterioridad a las incompatibilidades postzigóticas que afectan a ambos sexos. Existen dos causas ampliamente aceptadas que subyacen a la regla de Haldane:

- La “teoría de la dominancia” (Muller, 1940, 1942) sugiere que la regla de Haldane es la consecuencia de las incompatibilidades DM cuando los alelos implicados tienen un carácter recesivo. Así pues, cuando dichos alelos se encuentren en cromosomas autosómicos serán silenciados por los alelos dominantes presentes en los cromosomas homólogos. Pero en el caso de *loci* ligados al cromosoma X, los alelos recesivos causantes de las incompatibilidades DM sólo serán silenciados en el caso del sexo homogamético. Así pues, la teoría de la dominancia explica tanto la manifestación temprana de las incompatibilidades en sólo uno de los sexos como que el sexo afectado sea el heterogamético.
- La “teoría de la aparición temprana de efectos en machos” (Wu & Davis, 1993; Wu *et al.*, 1996) sugiere que los genes evolucionan más rápido en los machos debido a la selección sexual y a que la espermatogénesis es un proceso especialmente sensible a la hibridación. Sin embargo, esta teoría no

explica la regla de Haldane cuando las hembras constituyen el sexo heterogamético.

Las dos teorías mencionadas están ampliamente aceptadas porque existen numerosos trabajos que las sustentan (para una visión general del tema ver Coyne & Orr, 2004; Schilthuizen *et al.*, 2011). Existen otras ideas para explicar la regla de Haldane como la evolución más rápida del cromosoma X (Charlesworth *et al.*, 1987) o la meiosis dirigida por elementos genéticos egoístas (revisado por Hurst & Werren, 2001) pero que no están tan respaldadas por trabajos experimentales (Moehring, 2011).

1.3 Especiación: tipos y desarrollo del proceso.

El proceso de especiación puede estar ligado a diferentes escenarios y, conforme a éstos, se han definido distintos tipos de especiación. La clasificación más extendida hace referencia a la relación espacial que mantienen los grupos divergentes y en cómo afecta dicha situación al flujo génico. Según este criterio, podemos diferenciar tres tipos de especiación principalmente:

- (i) Especiación “alopátrica”: en este caso las poblaciones quedan aisladas por barreras extrínsecas al organismo, geográficas o ecológicas, de tal manera que el flujo génico entre ellas queda totalmente interrumpido. A partir de este momento, las poblaciones se diferenciarán debido a la adaptación a cada uno de sus respectivos ambientes o por selección sexual (especiación “vicariante”). También pueden estar implicados en la divergencia procesos estocásticos como la deriva genética cuando alguno de los grupos divergentes tiene tamaños poblacionales reducidos (especiación “peripátrica”).
- (ii) Especiación “parapátrica”: en esta situación existe flujo génico entre poblaciones adyacentes pero el intercambio de genes no se produce libremente. La reducción del flujo génico puede deberse a la adaptación local a lo largo de un gradiente o clina ambiental (especiación “clinal”), variaciones en la densidad poblacional a lo largo de un transecto que potencie la selección y la deriva genética (especiación de las “piedras de

paso”, del inglés *stepping-stone*) o a reordenaciones cromosómicas cuyo resultado es una mejor adaptación a un microambiente determinado pero que reduce el valor adaptativo de los híbridos entre las distintas razas cromosómicas (especiación “estasiopátrica”).

- (iii) Especiación “simpátrica”: en este caso el flujo genético no está impedido por ninguna barrera geográfica o ecológica. Sin embargo, los individuos se pueden especializar en explotar diferentes nichos ecológicos sufriendo selección natural disruptiva, divergir por selección sexual disruptiva, hibridar con otro grupo y que los híbridos estén más adaptados o que se produzca una poliploidización que provoque el aislamiento reproductivo.

Coyne y Orr (2004) hacen una exposición extensa y profunda sobre los tipos de especiación siendo una lectura muy recomendada para ahondar en este tema. También en este punto ha existido debate sobre qué tipo de especiación es el más habitual. Hasta las últimas dos décadas la mayoría de los biólogos evolucionistas consideraban la evolución alopátrica como la norma. Esto puede haberse debido a la mayor facilidad para encontrar evidencias de este tipo de especiación en la naturaleza y a que, matemáticamente, los modelos de especiación no alopátrica no han sido tan convincentes (Gravilets, 2014). Uno de los ejemplos mejor documentados de especiación alopátrica son las especies vicariantes de organismos acuáticos que se pueden encontrar en el océano Atlántico y Pacífico originadas tras la formación del Istmo de Panamá (Knowlton *et al.*, 1993). Sin embargo, en los últimos años no ha dejado de crecer el número de publicaciones que muestran evidencias de especiación no alopátrica (algunos ejemplos son Savolainen *et al.*, 2006; Rolán-Alvarez, 2007; Johannesson *et al.*, 2010, Papadopoulos *et al.*, 2011; Galindo *et al.*, 2013; Butlin *et al.*, 2014; Hadid *et al.*, 2014).

Fuera como fuese, hay que recordar que el CBE considera el aislamiento reproductivo como el producto de la divergencia y no la causa. Dicho de otro modo, el motor de la especiación es la selección con la participación de la deriva genética en algunos casos. La consecuencia de la adaptación diferencial es la aparición de barreras intrínsecas de aislamiento reproductivo. El desarrollo de nuevas tecnologías ha permitido el estudio del proceso a nivel génico pudiéndose determinar en algunos casos qué genes están implicados, cómo han divergido e, incluso, la aparición de

incompatibilidades DM (Wu, 2001; Wu & Ting, 2004). Así pues, se ha podido observar cómo la selección tiene un papel preponderante en la especiación actuando sobre los genes responsables de la adaptación diferencial o “genes de especiación” (Presgraves, 2010). Además, se ha relajado la idea del aislamiento reproductivo ya que la identidad de las especies puede permanecer inalterable si no hay flujo génico que afecte a los genes de especiación, aunque exista cierto intercambio de otros genes o marcadores neutros (Wu, 2001; Coyne & Orr, 2004).

En definitiva, se ha conseguido tener una visión de la especiación como un proceso continuo donde el aislamiento reproductivo va apareciendo poco a poco durante las distintas etapas del proceso (Wu, 2001). En una primera fase, un pequeño grupo de genes funcionales divergen en cualquiera de las situaciones posibles (alopatría, simpatría, etc.). No existe aislamiento reproductivo evidente, aunque el intercambio en los genes de especiación (y regiones genómicas adyacentes) está restringido por los diferentes ambientes a los que se han adaptado.

En una segunda fase, se acumula mayor divergencia y empieza a aparecer coadaptación entre los genes de cada grupo divergente. El cruzamiento entre individuos de diferente grupo da origen a algunas combinaciones genotípicas inviables, que puedan producir esterilidad, comportamientos extraños o peor adaptación a los ambientes naturales de los parentales. Seguramente, se empieza a constatar la regla de Haldane anteriormente comentada (apartado [1.2](#)). Sin embargo, se seguirá produciendo intercambio en una gran parte del genoma. En este punto, a los grupos divergentes se les da a veces el estatus de “subespecies”. La trayectoria evolutiva (fusión vs. especiación) dependerá de la intensidad de la coadaptación de los genes dentro de cada especie incipiente, y de la frecuencia con que se rompan los grupos de ligamiento. Tanto la arquitectura genética de la diferenciación (el número de *loci* implicados, su localización cromosómica, la reducción del valor adaptativo de los híbridos, etc.), como la intensidad del flujo génico entre las especies incipientes son cruciales.

En el tercer estadio, los grupos divergentes han pasado el punto de no retorno. Ha divergido un número suficiente de *loci* que interaccionan entre sí y ya no es posible que se den híbridos para los genes de especiación. Es cuando podemos hablar de “buenas especies” aunque el aislamiento reproductivo no afecte a todas las partes del genoma y ciertos genes de una especie puedan adentrarse o introgresar en la otra. En

este punto es donde el proceso de reforzamiento podrá jugar un papel fundamental (Bank *et al.*, 2012).

En la cuarta etapa, las especies divergentes presentan un aislamiento reproductivo total. Existen barreras reproductivas prezigóticas previas al apareamiento, los híbridos son inviables o estériles en ambos sexos y cualquier tipo de introgresión sería eliminada por selección.

1.4 Zonas híbridas.

La existencia de dos grupos de individuos diferenciados hace posible la formación de una “zona híbrida”. Dicho término hace referencia a un espacio donde dos taxones distinguibles se encuentran, se cruzan entre ellos y dejan descendencia híbrida con características intermedias de ambos grupos (Barton & Hewitt, 1985; Harrison, 1990). Las zonas híbridas se pueden clasificar según los tipos de especiación comentados anteriormente (Mayr, 1942). Una zona de “contacto primario” será aquella en la que los grupos se han diferenciado en simpatría. Por el contrario, se habla de un “contacto secundario” cuando los grupos han permanecido aislados geográficamente acumulando diferencias durante más o menos tiempo. Tras dicho periodo, los taxones se encuentran de nuevo y se cruzan dejando descendencia híbrida. En la mayoría de las zonas híbridas existentes resulta muy difícil distinguir entre ambos casos (Endler, 1982).

Una vez originada la zona híbrida existirá un flujo génico entre los dos grupos que la originan. Este intercambio genético será mayor o menor según el grado de aislamiento reproductivo existente. Si las barreras reproductivas no son lo suficientemente potentes, la zona híbrida tenderá a difuminarse y las poblaciones a homogeneizarse. Otras zonas híbridas de carácter transitorio serían aquellas en las que uno de los grupos parentales se extingue o, por reforzamiento, se llega a un aislamiento reproductivo total. En cualquiera de los tres casos estaríamos ante una zona híbrida “efímera”. Por el contrario, la zona híbrida puede permanecer estable y su dinámica dependerá de distintas fuerzas (Moore, 1977).

Se han propuesto varios modelos que explican el mantenimiento de las zonas híbridas. Por un lado encontramos aquellos que son independientes de la dispersión de los individuos y en los que sólo actúa la selección. En estos modelos los híbridos tienen un mayor valor adaptativo dentro de la zona híbrida que los parentales (Endler, 1977). Es lo que se ha denominado “superioridad híbrida limitada” (Moore, 1977). Por otro lado encontramos los modelos dependientes de dispersión. En éstos el mantenimiento de la zona híbrida responde a un equilibrio entre dispersión y selección. Dentro de dichos modelos podemos diferenciar distintos tipos:

- i) Modelo ecotonal o “zonas mosaico” (Harrison & Rand, 1989). Este modelo propone la existencia de heterogeneidad ambiental que genera un ambiente mosaico compuesto por diferentes parcelas o “parches”, que son ocupadas por taxones muy relacionados pero que difieren en sus patrones de utilización de hábitats. Sería el caso de la especiación simpátrica y las zonas de contacto primario.
- ii) Modelos que proponen un equilibrio entre dispersión y selección en contra de híbridos:
 - ii.a) Inferioridad híbrida o “zonas de tensión”. En este caso los híbridos tienen un valor adaptativo inferior al de los parentales (Barton & Hewitt, 1985).
 - ii.b) Selección dependiente de frecuencias. El valor adaptativo de los híbridos no es menor que el de los parentales pero existe mayor depredación de aquellas formas que son más frecuentes. (Mallet, 1986).

Por último, en la evolución de estas regiones se ha propuesto también la aparición de un tercer taxón, híbrido e independiente, diferente de los que han dado lugar a la zona híbrida. Son procesos que se han venido a denominar de “especiación por hibridación” y aunque existen algunas evidencias experimentales, resultan muy controvertidos (Arnold, 1992; Barton, 2001; Buerkle *et al.*, 2000; Abbott *et al.*, 2013; Hochkirch *et al.*, 2013; Servedio *et al.*, 2013; Nadeau, 2014).

A través de una zona híbrida se establece una transición de las características propias de un grupo a las del otro. Esto se refleja en gradientes de frecuencias de los distintos marcadores que diferencian a ambos grupos y que reciben el nombre de “clinas” (Huxley, 1938). Las clinas suelen tener una forma sigmoidea pudiéndose describir y analizar mediante modelos matemáticos y, de esta forma, determinar sus centros y anchuras (Haldane, 1948). Conocer estos parámetros es muy importante, pues de ellos, y de la relación que exista entre las diferentes clinas, se puede obtener valiosa información sobre la dinámica de la zona híbrida (Barton, 1979; Barton & Hewitt, 1985; Vines, 2014). Las clinas de los distintos caracteres de una zona híbrida pueden ser “concordantes” o “coincidentes” respecto a la relación espacial que guarden. Dos clinas son concordantes si presentan la misma anchura o pendiente y se las considera coincidentes si sus centros se encuentran en el mismo punto geográfico.

En numerosas ocasiones las zonas híbridas muestran clinas coincidentes para muchos de los caracteres implicados. Esta coincidencia no es esperable para aquellos marcadores seleccionados en respuesta a un gradiente ambiental ya que cada uno de los caracteres responderá de forma diferente a las condiciones existentes (Hewitt, 1988). Sin embargo, esta situación sí que encaja con lo esperado en aquellas zonas híbridas de contacto secundario mantenidas por un equilibrio entre dispersión y selección en contra de híbridos, lo que conocemos como zonas de tensión (Barton & Hewitt, 1985; Smith *et al.*, 2013). La coincidencia de clinas puede responder a varios factores:

- Puede reflejar el punto geográfico donde los dos taxones que han divergido en alopatría entran en contacto.
- Los puntos de baja densidad poblacional pueden funcionar como trampas que atrapen las clinas de aquellos caracteres que estén bajo selección en contra de híbridos.
- Las clinas de caracteres que muestran menor valor adaptativo de los híbridos pueden atraerse unas a otras.

La clina de un carácter neutro tiene una pendiente suave, mientras que la de un carácter bajo selección diferencial a ambos lados de la zona híbrida es abrupta a modo de escalón. Cuanto mayor sea el coeficiente de selección en contra de los híbridos mayor será la pendiente de la clina y menor su anchura. En una zona híbrida distintos marcadores pueden mostrar clinas con diferentes perfiles debido a la diferente selección

sobre cada carácter, o sobre los *loci* ligados a ellos. En este caso se observarían clinas no concordantes (de diferente anchura). La clina de un mismo carácter puede variar su anchura en distintas localidades como resultado de un gradiente ambiental diferente, por diferencias en la estructura poblacional entre localidades, por diferenciación genética dentro de los taxones o como resultado de la “modificación”. La modificación de una zona híbrida supone una serie de cambios genéticos tendentes a una reducción de la presión de selección en contra de los híbridos. Puede producirse por la selección de aquellas combinaciones híbridas con mayor valor adaptativo tras varias generaciones de recombinación (Searle, 1986) o por la reducción de la producción de híbridos mediante reforzamiento (Butlin, 1987).

Las zonas híbridas pueden verse también como zonas de “introgresión” (Mayr, 1963). Se habla de introgresión cuando un alelo propio de una población se adentra en otra población de la cual no es característico. Dos caracteres pueden introgresar de forma diferencial siendo sus clinas no coincidentes.

El análisis de las clinas de los distintos caracteres en una determinada localidad y la comparación de estas clinas entre localidades puede aportar mucha información sobre el origen, mantenimiento y destino de una zona híbrida (Smith *et al.*, 2013). Además, permite analizar la influencia de las distintas variables ambientales, de la estructura poblacional y estudiar procesos como el reforzamiento. Así mismo, permiten estudiar qué caracteres podrían estar bajo la influencia de un proceso de selección divergente (genes de especiación) y determinar la naturaleza de las barreras reproductivas que los afectan (intrínsecas o extrínsecas). En definitiva, el estudio de las zonas híbridas comporta el estudio del aislamiento reproductivo (barreras prezigóticas y postzigóticas), del proceso de especiación (las diferentes etapas y modos), y del propio concepto de especie (CBE). Por todo lo expuesto hasta ahora, no es difícil entender que las zonas híbridas haya sido calificadas como “ventanas abiertas a los procesos evolutivos” (Harrison, 1990) o “laboratorios naturales” donde poder estudiar la naturaleza de las fuerzas evolutivas que conducen a la formación de nuevas especies (Hewitt, 1988).

CHORTHIPPUS PARALLELUS

2.1 Breve descripción de la especie.

Chorthippus parallelus (Zetterstedt 1821) es un saltamontes extremadamente común en Europa, perteneciente a la subfamilia Gomphocerinae dentro de la familia Acrididae. Vive en praderas húmedas pudiéndose encontrar desde el nivel del mar hasta un límite altitudinal de 2000 metros, aproximadamente. Su rango de distribución se extiende desde el sur de Europa, en aquellas montañas que alcanzan cierta altura, hasta el sur de la Península Escandinava y desde Europa Occidental hasta Mongolia. Son organismos herbívoros con un ciclo de vida anual. Nacen a finales de la primavera y llegan a



Hembra y macho de *C. parallelus* apareándose. El tamaño de la hembra es sensiblemente mayor que el del macho. Foto realizada por J.L. Bella.

la fase adulta bien entrado el verano. Tras aparearse, las hembras depositan los huevos agrupados en unas estructuras denominadas “puestas” que contienen de 5 a 10 huevos y que entierran en zonas donde el suelo retenga cierta humedad. Al final del verano, los adultos desaparecen mientras que continúa el desarrollo embrionario dentro de los huevos fertilizados. Con la bajada de las temperaturas, los embriones interrumpen su desarrollo y entran en diapausa obligada durante el invierno. Al llegar la nueva primavera se reinicia el desarrollo embrionario que conduce a la eclosión de los huevos al final de la estación. Las hembras, generalmente braquípteras, suelen alcanzar una longitud de unos 2 cm mientras que los machos, más pequeños, miden unos 1,5 cm. A diferencia de otros ortópteros, *C. parallelus* no puede volar. Virdee y Hewitt (1990) estimaron la dispersión media de esta especie en unos 30 m/generación.

2.2 *C. parallelus*: diferenciación durante el Cuaternario y filogeografía.

Faber (1958) distinguió la especie *C. erythropus* de *C. parallelus* por su estructurado canto de cortejo, la ausencia de canto territorial y una marcada coloración roja en la tibia de las patas traseras. Más tarde, Reynolds (1980) rebajó el estatus de

estos dos taxones al nivel de subespecies y encontró que *C. p. erythropus* posee un mayor número de púas en el aparato estridulador. Se han realizado estudios en *C. parallelus* con ADN mitocondrial, ribosómico y nuclear, además de análisis citogenéticos, para analizar el grado de estructuración genética dentro de esta especie, así como su filogeografía (Gosálvez *et al.*, 1988; Cooper & Hewitt, 1993; Cooper *et al.*, 1995; Szymura *et al.*, 1996; Lunt *et al.*, 1998, Bella *et al.*, 2007, Korkmaz *et al.*, 2014; etc.).

En Europa, existen varias razas geográficas. *C. p. parallelus* (Cpp) está ampliamente distribuido por el norte de Europa pero es reemplazado en la Península Ibérica por *C. p. erythropus* (Cpe). Se reconoce la existencia de una tercera subespecie en Grecia denominada *C. p. tenuis* y, al menos, otras dos razas geográficas localizadas en Italia y Turquía. Del patrón filogeográfico encontrado, destaca el hecho de que cuatro de los cinco grupos diferenciados se circunscriben a las penínsulas mediterráneas. El quinto grupo, *C. parallelus parallelus*, se extiende por el resto del continente y su origen se sitúa en la región de los Balcanes o la Península de Anatolia (Korkmaz *et al.*, 2014). Destaca también la gran diversidad genética observada en el sur de Europa frente a la uniformidad encontrada en las poblaciones del norte (Hewitt, 1996).

Como muchas otras especies de plantas y animales de Europa, la distribución de este saltamontes parece ser consecuencia de los ciclos de expansión-contracción del hielo acontecidos durante las glaciaciones del Cuaternario (Hewitt, 1993; 1996; 1999; 2000; 2001; 2011; Figura 2.2.1). Este periodo comienza hace 2,5 millones de años (Ma). La Tierra viene sufriendo un enfriamiento progresivo que ha provocado la formación de capas de hielo permanentes en ambos casquetes polares. Dentro de este proceso, se pueden diferenciar momentos más fríos (periodo glacial) de otros más cálidos (periodo interglaciar), como el actual. La orografía del continente europeo al inicio del Cuaternario es prácticamente igual a como la conocemos hoy en día. Sin embargo, el nivel del mar está influenciado por la mayor o menor acumulación de agua en forma de hielo: disminuyendo el nivel durante un periodo glacial y aumentando cuando parte del hielo acumulado se derrite durante un periodo interglaciar. Estas variaciones del nivel del mar permiten la aparición en determinados momentos de puentes de tierra que unen territorios antes aislados por el agua.

Mediante la medición de diferentes isótopos del fondo marino (Andersen & Bjorns, 1994) y gracias al estudio de los cilindros de hielo obtenidos en varias catas realizadas en Groenlandia (NGRIP community members, 2004), y en la Antártida (EPICA community members, 2004), se ha podido determinar la duración de los distintos ciclos glacial-interglacial ocurridos. Durante la primera parte del Cuaternario (hasta hace 1 Ma, aproximadamente), la duración de los ciclos era de unos 41.000 años. Sin embargo, hace unos 0,9 Ma la periodicidad cambió pasándose a ciclos de unos 100.000 años de duración con cambios muy fuertes en las condiciones climatológicas (Figura 2.2.1A). Estas variaciones están íntimamente relacionadas con las oscilaciones de la órbita terrestre alrededor del Sol o ciclos de Croll-Milankovitch que muestran periodicidades de 100.000, 41.000 y 21.000 años. En los últimos 740.000 años ha habido 8 ciclos glacial-interglacial, los cuatro más recientes dentro de los últimos 430.000 años.

Hace 33.000 años comenzó a aumentar la extensión de los hielos permanentes hasta alcanzarse, hace unos 26.500 años, el último máximo glacial (UMG). Durante el UMG los hielos permanentes cubrían gran parte del norte de Europa llegando hasta el sur de las Islas Británicas. Los grandes sistemas montañosos del sur de Europa estaban cubiertos también por glaciares. Durante la estación fría, el Golfo de Vizcaya quedaba totalmente congelado. La tundra se extendía por Francia, Europa Central y Rusia, presentando suelos congelados o *permafrost*. Sólo las zonas llanas de las penínsulas mediterráneas estaban libres de hielos y *permafrost* (Figura 2.2.1B). Estas condiciones permanecieron prácticamente igual hasta que finalizó el UMG hace unos 19.000 años. A partir de entonces comenzó un periodo de calentamiento global sólo interrumpido por el llamado “Dryas Reciente” (del inglés *Younger Dryas*). Desde hace unos 10.000 años, la temperatura ha permanecido más o menos estable con pequeñas variaciones pero siempre dentro de un periodo claramente interglacial (Figura 2.2.1C).

Así pues, las distribuciones de las especies presentes en el norte del continente europeo durante los periodos interglaciares se vieron desplazadas hacia el sur durante los periodos de máxima glaciación. Las penínsulas mediterráneas se convirtieron en los refugios donde perduraron muchas especies durante los largos y gélidos periodos glaciales. De esta forma, muchas de las especies quedaron divididas en grupos aislados por el mar circundante y por los grandes sistemas montañosos (Figura 2.2.1B). Esta circunstancia favorecería la diferenciación genética entre grupos por adaptación al

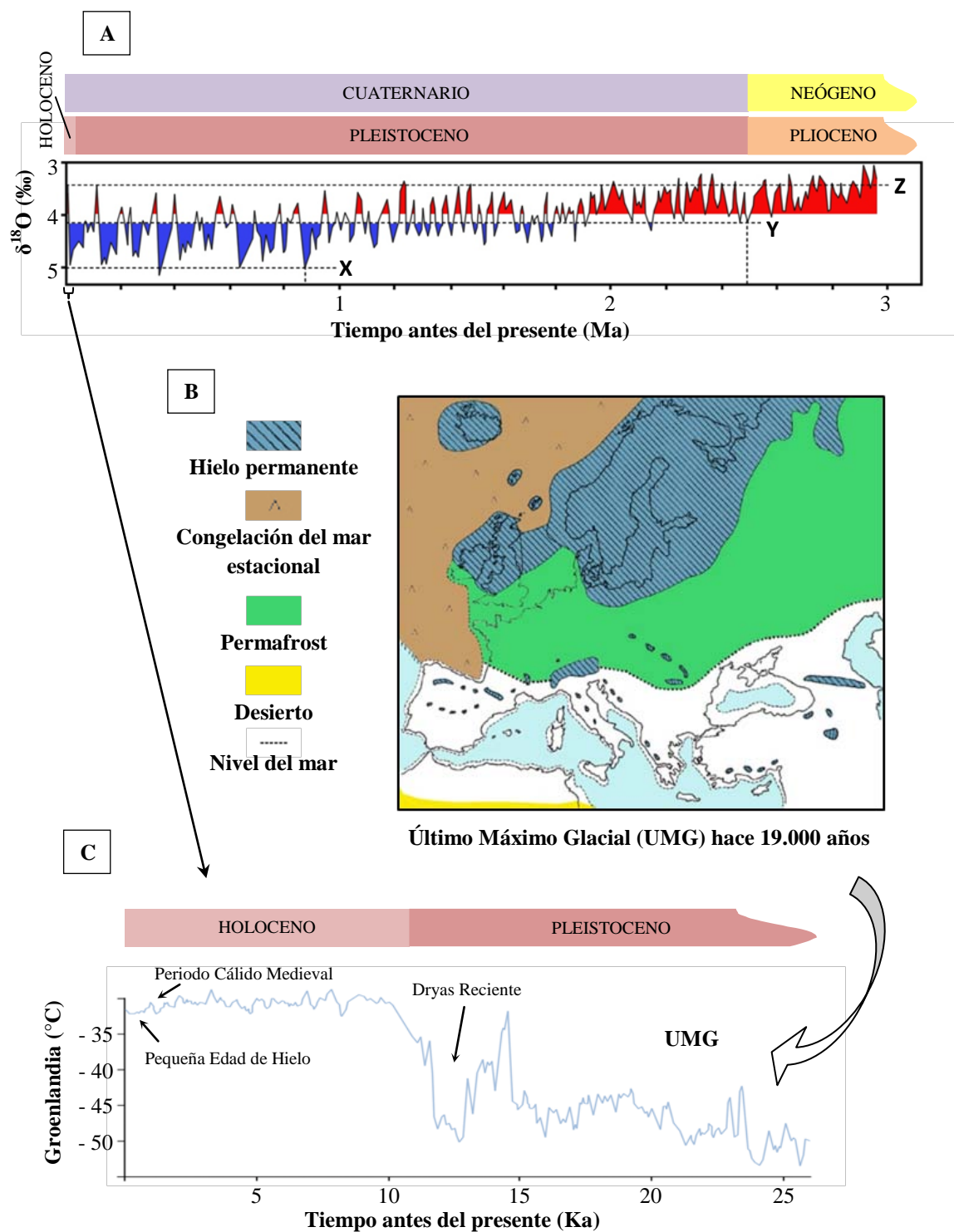


Figura 2.2.1. Las glaciaciones del Cuaternario. A, oscilaciones climáticas durante el Cuaternario registradas mediante las variaciones de isótopos del fondo marino: X, proporción de isótopos presente hace unos 0,9 Ma cuando comenzó el primer ciclo de 100 Ka (miles de años) de duración; Y, proporción presente hace unos 2,5 Ma al comienzo del Cuaternario; Z, proporción de isótopos en la actualidad (modificado de Hewitt 2011). B, situación de Europa durante el último máximo glacial (modificado de Hewitt 1999). C, temperatura sobre Groenlandia inferida a partir de isótopos presentes en cilindros de hielo (Alley, 2004).

ambiente presente en cada una de las penínsulas, deriva génica, etc. Con la retirada de los hielos, se recolonizarían las tierras liberadas hacia el norte. Los grupos diferenciados pudieron encontrarse de nuevo, originando zonas híbridas con mayor o menor flujo génico. Esta hibridación se vería interrumpida con la llegada de un nuevo máximo glacial, durante este nuevo episodio frío volverían a acumularse diferencias en los refugios peninsulares. Este proceso se pudo repetir con cada ciclo glacial-interglacial y explica la filogeografía encontrada en gran parte de las especies de Europa (Hewitt, 1996; 1999; 2000; 2001; 2011).

En el caso de *C. parallelus*, Cooper y Hewitt (1993) establecieron que la divergencia encontrada entre las poblaciones estudiadas de Francia (Cpp) y la Península Ibérica (Cpe) debió comenzar entre 0,2 y 2 Ma antes del momento actual basándose en ciertas secuencias nucleares. Por otra parte, estudios basados en secuencias mitocondriales sitúan el comienzo de la divergencia entre estas subespecies hace unos 0,3 - 0,5 Ma (Szymura *et al.*, 1996; Lunt *et al.*, 1998). A pesar de los grandes márgenes de error, estas dos cifras concuerdan y sugieren que esta especie de saltamontes ha sufrido 4 o 5 ciclos glacial-interglacial (Figura 2.2.1A). Por otra parte, los estudios poblacionales realizados con ambos tipos de secuencias a lo largo del continente

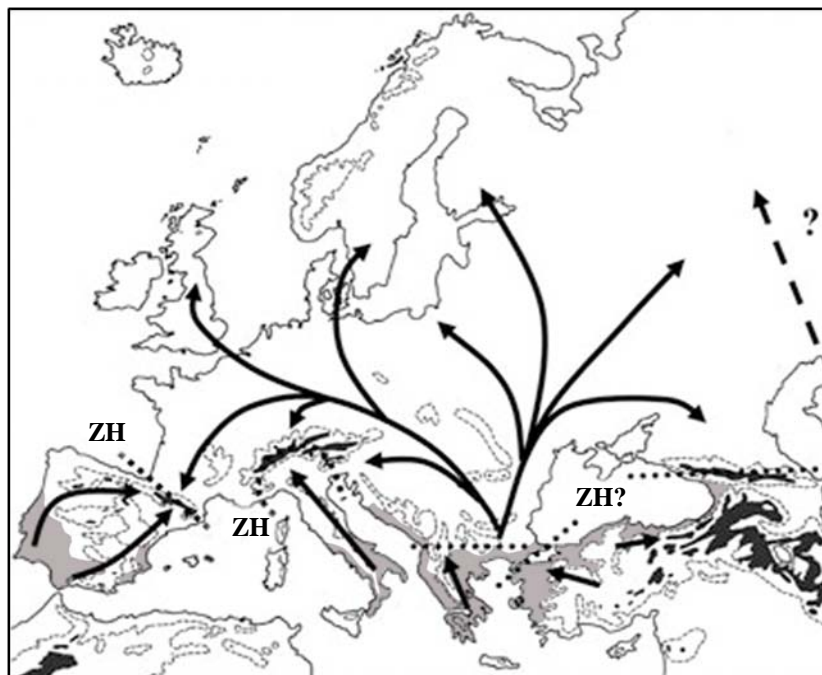


Figura 2.2.2. Rutas de recolonización y zonas híbridas. Se muestran los posibles refugios de *C. parallelus* durante los máximos glaciares (zonas en gris), las posibles rutas de recolonización (flechas) y las posibles zonas híbridas (ZH). Las zonas híbridas de los Balcanes, Bósforo y Cáucaso no están confirmadas (ZH?). Las áreas con una altitud superior a los 900 m están indicadas por las líneas discontinuas y las

superiores a 1800 m aparecen en negro. Modificado a partir Hewitt 2011. Se ha añadido la información sobre los posibles refugios peninsulares procedente de Hewitt 1996.

europeo respaldan la hipótesis de la divergencia en los refugios peninsulares (Cooper *et al.*, 1995; Lunt *et al.*, 1998; Hewitt, 2011; Korkmaz *et al.*, 2014). Además, se han podido trazar las rutas de recolonización post-glacial a partir de dichos refugios, así como predecir la existencia de zonas híbridas (Figura 2.2.2). Algunas de estas zonas híbridas han sido corroboradas, como la presente en los Alpes (Flanagan *et al.*, 1999). Por su parte, la zona híbrida confirmada en los Pirineos es un caso especial pues, como comprobaremos a continuación, ha sido objeto de numerosos estudios que se siguen desarrollando en la actualidad.

2.3 La zona híbrida de *C. parallelus* en Pirineos.

C. p. parallelus y *C. p. erythropus* forman una zona híbrida a lo largo de los Pirineos. Este sistema montañoso representa una barrera geográfica formidable para la especie. Alrededor de 200 de las cimas pirenaicas alcanzan alturas superiores a los 3000 m, muy por encima del límite altitudinal del saltamontes (2000 m, aproximadamente). Esto provoca que el contacto entre las dos subespecies se produzca en los extremos del sistema montañoso y a través de los valles transversales, siempre que no se supere dicho límite altitudinal (Figura 2.3.1).

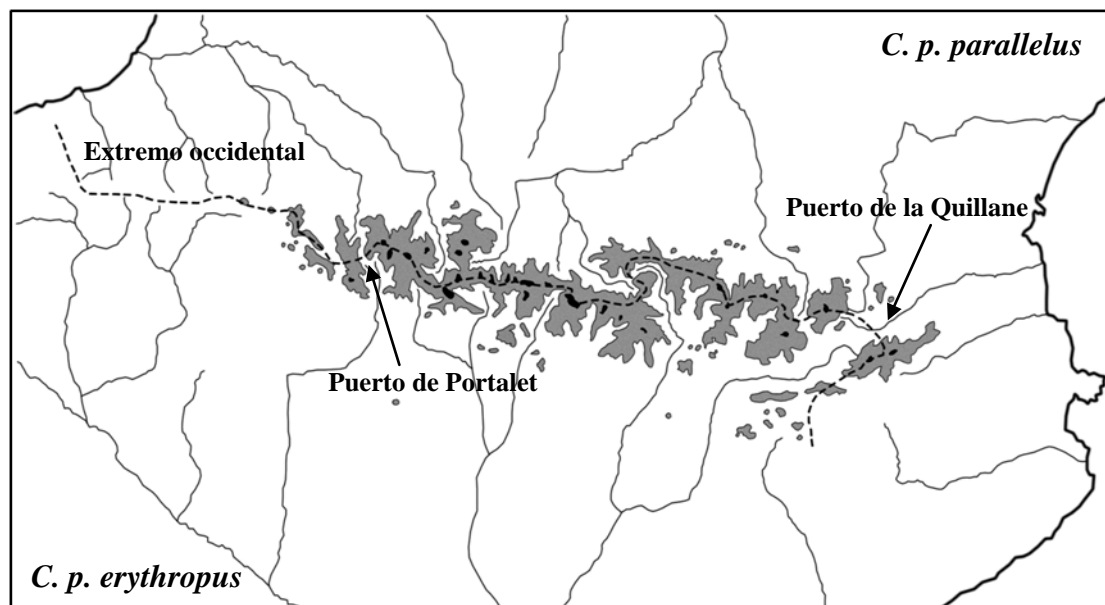


Figura 2.3.1. Zona híbrida de *C. parallelus* en Pirineos. La línea discontinua muestra por donde transcurre la zona híbrida si bien su localización en el extremo oriental es incierta. Las áreas en gris incluyen alturas por encima de los 2000 m y en negro las superiores a 3000 m. Se indican los nombres de las zonas de contacto mejor estudiadas. Modificado de Hewitt, 1993.

Aunque normalmente es difícil discriminar entre contacto primario y secundario (apartado [1.4](#)), distintos indicios apuntan a que esta zona híbrida se origina por el contacto secundario ocurrido entre Cpp y Cpe hace no más de 10.000 años (Hewitt, 1993). Sabemos que este saltamontes no estuvo presente en los Pirineos durante el UMG dadas las condiciones paleoclimáticas del momento (Figura 2.2.1B). Paralelamente al incremento de las temperaturas se inició, hace unos 10.000 años, la recolonización del continente desde los refugios del sur hacia el norte. No obstante, las condiciones desfavorables perduraron en los grandes sistemas montañosos del sur de Europa, más o menos tiempo dependiendo del gradiente altitudinal. Procedente de la región balcánica, Cpp se propagó rápidamente hacia el norte y oeste del continente europeo ayudado por la orografía del terreno, que no presenta grandes elevaciones. Sin embargo, Cpe no encontró las condiciones apropiadas para atravesar los Pirineos hasta mucho más tarde debido a la gran altitud de sus cumbres. Sólo cuando los elevados pasos montañosos fueron habitables, los saltamontes pudieron transitar de una vertiente a otra pero, para entonces, Cpp ya se había establecido, ocupando la cara norte de los Pirineos. La rápida expansión de Cpp desde los Balcanes queda reflejada en la filogeografía del saltamontes (apartado [2.2](#)). Por otro lado, esta subespecie está presente en las Islas Británicas, lo que sugiere que Cpp tuvo que salir de su refugio en los Balcanes y colonizar Inglaterra antes de la formación del Canal de la Mancha hace unos 8.000 años.

La propia existencia de la zona híbrida constata el cruzamiento entre individuos de ambas subespecies. Sin embargo, los machos F1 procedentes de cruzamientos entre individuos puros Cpp y Cpe realizados en laboratorio sufren disfunción testicular siendo completamente estériles (Hewitt *et al.*, 1987a; Bella *et al.*, 1990). Este hecho evidencia la existencia de barreras de aislamiento reproductivo postzigóticas (apartado [1.2](#)). Además, la selección en contra de estos híbridos F1 sugiere que estamos ante una zona de tensión (apartado [1.4](#)). No obstante, las hembras F1 resultantes de estos mismos cruzamientos son fértiles siendo un buen ejemplo de la regla de Haldane (apartado [1.2](#)). La descendencia de los retrocruzamientos de dichas hembras con machos puros, así como la de los cruzamientos subsiguientes, es viable y fértil (Virdee & Hewitt, 1992). Esto ha permitido que, una vez ocurrido el contacto secundario, existiera cierto flujo génico entre las poblaciones parapátricas de Cpp y Cpe, originándose la zona híbrida que conocemos en la actualidad. Además, es probable que se hayan producido ciertas

modificaciones bajo la acción de la selección natural (apartado [1.4](#)), pues actualmente no se observa disfunción testicular ni otras manifestaciones de la selección en contra de híbridos en poblaciones naturales.

Otra característica que pone de manifiesto la existencia de barreras de aislamiento reproductivo entre ambas subespecies es la “homogamia asimétrica” (Bella *et al.*, 1992). En cruzamientos realizados en laboratorio se comprobó que, cuando una hembra Cpp se cruzaba de forma secuencial con machos Cpp y Cpe (o en el orden inverso), se obtenía un déficit de individuos híbridos en la descendencia. Esto no se observaba, o se detectaba en menor medida, en aquellos cruzamientos en los que la hembra era Cpe. No queda claro si este fenómeno ocurre como consecuencia de la preferencia o competencia espermática (aislamiento prezigótico), o por algún tipo de incompatibilidad que actúe después de la fertilización (aislamiento postzigótico).

Al existir aislamiento postzigótico, como ocurre en la zona híbrida de *C. parallelus*, el sistema de reconocimiento de pareja (SRP) puede estar dirigido por la selección en un proceso de reforzamiento que evite la hibridación (apartado [1.2](#)). En experimentos de elección de pareja, se ha observado que Cpp y Cpe han divergido lo suficiente en sus SRPs como para provocar un considerable aislamiento prezigótico entre poblaciones puras geográficamente alejadas (Ritchie *et al.*, 1989). Sin embargo, esta preferencia en la elección de pareja se diluye según nos acercamos al centro de la zona híbrida, lo que no sería consistente con la idea de reforzamiento (Butlin, 1998). Probablemente, este proceso tuvo su oportunidad cuando se produjo el primer contacto entre ambas subespecies pero no llegó a prosperar al disminuir la selección en contra de los híbridos como consecuencia de las modificaciones comentadas anteriormente.

Cpp en la vertiente norte y Cpe en la vertiente sur de Pirineos, habitan las praderas existentes desde la falda de las montañas hasta el límite altitudinal de la especie. La zona híbrida en Pirineos transcurre siguiendo de forma precisa la línea que forman las cotas más altas del sistema montañoso (Hewitt, 1993). Este hecho sugiere que las subespecies fueron ascendiendo por las montañas desde Francia o España según mejoraban las condiciones climáticas y se establecía la vegetación que le pudiera servir de alimento. Que la zona híbrida se encuentre actualmente en los pasos y praderas donde el hielo tardó más en desaparecer, implica que la zona híbrida no se ha desplazado muy lejos de su posición original. Esta estabilidad es algo habitual de las

zonas de tensión (Barton & Hewitt, 1985). Aunque las zonas de tensión pueden moverse, tienden a quedar atrapadas en aquellos lugares con menor densidad de población pudiendo permanecer en el mismo sitio de forma muy estable a lo largo del tiempo. Los elevados pasos de la zona central de los Pirineos, donde se produce la hibridación, se encuentran en el límite del rango de distribución de la especie. Las condiciones aquí no son las más óptimas para el saltamontes, pudiendo encontrarse poblaciones con menores densidades que en otras localidades situadas a altitudes más bajas (Virdee, 1991). Hay evidencias de que ocurre lo mismo en otras zonas híbridas de características similares, como es el caso de la descrita en *Podisma pedestris* en los Alpes Marítimos (Barton & Hewitt, 1981).

2.4 Rasgos diferenciales y clinas en la zona híbrida.

Hay varios caracteres morfológicos que han sido objeto de estudio en *C. parallelus* (Butlin & Hewitt, 1985a; Butlin *et al.*, 1991). Entre dichos caracteres podemos encontrar las longitudes de la prozona y la metazona del pronoto, las longitudes de las alas anteriores y posteriores o la longitud y anchura de los fémures. En los machos se han estudiado también, además de la coloración rojiza de la tibia y del número de púas del aparato estridulador, la longitud de la fila formada por dichas púas y la longitud de los cercos que presentan al final del abdomen. Por otro lado, en las hembras se han estudiado las longitudes de los escleritos apicales y laterales que forman la valva ventral del ovopositor. Aunque existen diferencias en estos caracteres, tan sólo el número de púas permite separar correctamente a los machos de ambas subespecies. Respecto a las hembras, la longitud del ovopositor (suma de los escleritos apicales y laterales) es el carácter que muestra diferencias más acusadas. Sin embargo, sólo es posible distinguir entre las subespecies a nivel poblacional, comparando las medias para dicho rasgo.

También se han buscado diferencias enzimáticas entre las subespecies (Butlin & Hewitt, 1985a). Sin embargo, tan sólo un *locus* (esterasa-2), de 16 analizados, muestra diferencias significativas entre Cpp y Cpe en las frecuencias de las isoenzimas detectadas.

Los estudios referidos a comportamiento se centran en los cantos que realizan los machos para atraer y estimular a las hembras (Butlin & Hewitt, 1985b; Ritchie *et al.*, 1989). La estructura del canto de este tipo de insectos se puede dividir en sílabas que forman esquemas que, a su vez, se repiten en secuencias. Las secuencias están separadas por intervalos de silencio más duraderos (alrededor de 100 segundos) que los intervalos que separan los esquemas que componen una secuencia (alrededor de 10 segundos). De esta forma, se pueden medir la duración de las sílabas, el número de sílabas por esquema, la duración del esquema, el número de esquemas por secuencia, etc. Por otro lado, se puede diferenciar entre el “canto de llamada” producido por machos aislados para atraer a las hembras y el “canto de cortejo”, que es previo a la cópula. El canto de llamada de Cpp incluye un mayor número de esquemas, aunque las sílabas contenidas en ellos son de menor duración que en Cpe. Por su parte, Cpe emite secuencias más cortas en su canto de llamada, aunque lo compensa con cantos de cortejo de mayor duración y que poseen una estructura repetitiva que está ausente en Cpp.

También se ha estudiado la secuencia de ADN nuclear no codificante *cpnl-1* (Vázquez *et al.*, 1994; Korkmaz *et al.*, 2014). En esta secuencia, utilizada para inferir la filogeografía de *C. parallelus* como se comentó anteriormente, se puede distinguir una inserción de 5pb en los haplotipos de Cpe (I5) que no existe en los haplotipos de Cpp (I0).

El complemento cromosómico de *C. parallelus*, descrito por primera vez por John y Hewitt (1966), está formado por tres pares de cromosomas submetacéntricos (L₁-L₃), cuatro pares medianos acrocéntricos (M₄-M₇), un par de cromosomas pequeños acrocéntricos (S₈) y el cromosoma sexual que también es acrocéntrico (X). Las hembras son homogaméticas (XX) mientras que los machos son heterogaméticos (XO). Existen diferencias entre ambas subespecies en el patrón de distribución y en la composición de bandas de heterocromatina constitutiva o “bandas-C” presentes en el complemento (Gosálvez *et al.*, 1988; Bella *et al.*, 1993; Ferris *et al.*, 1993; Buño *et al.*, 1994; Serrano *et al.*, 1996; Bella *et al.*, 2007). De entre ellas, destaca la presencia de una banda distal en el cromosoma X de Cpp (banda P) que está ausente en Cpe. Esta banda lleva asociada una región organizadora del nucléolo (del inglés, NOR), completamente funcional, que también está ausente en Cpe. Por otra parte, Cpe muestra una banda subproximal en el cromosoma X (banda E) de la que carece Cpp.

Hay tres regiones de los Pirineos que se han estudiado en mayor o menor profundidad: Puerto de la Quillane y Puerto de Portalet, con gran detalle; y el extremo occidental, en menor grado (Figura 2.3.1). En estas regiones, los caracteres que diferencian ambas subespecie y descritos anteriormente, varían siguiendo un patrón clinal norte-sur. Dentro de las dos regiones mejor estudiadas, una gran parte de dichos caracteres presentan clinas coincidentes situadas en zonas que pueden actuar como trampas ya que la densidad del saltamontes es menor. Se ha constatado que el número de púas del peine estridulador resulta un buen carácter para establecer el centro de la zona híbrida. Además, algunos de los caracteres están aparentemente bajo selección, ya que varían en distancias cortas mostrando clinas de poca anchura (Butlin *et al.*, 1991; Hewitt, 1993; Butlin, 1998). Esta situación es compatible con el comportamiento esperado en una zona de tensión (apartado 1.4). No obstante, ciertos caracteres presentan clinas cuyos centros están desplazados respecto del resto. Este es el caso de la banda P, con el NOR asociado, que porta el cromosoma X típico de Cpp (Figura 2.4.1). Tanto en el Puerto de Portalet como en el Puerto de la Quillane, la clina de este marcador cromosómico introgressa varios kilómetros en la zona híbrida hacia el lado de Cpe (Ferris *et al.*, 1993; Serrano *et al.*, 1996). También se ha detectado en poblaciones

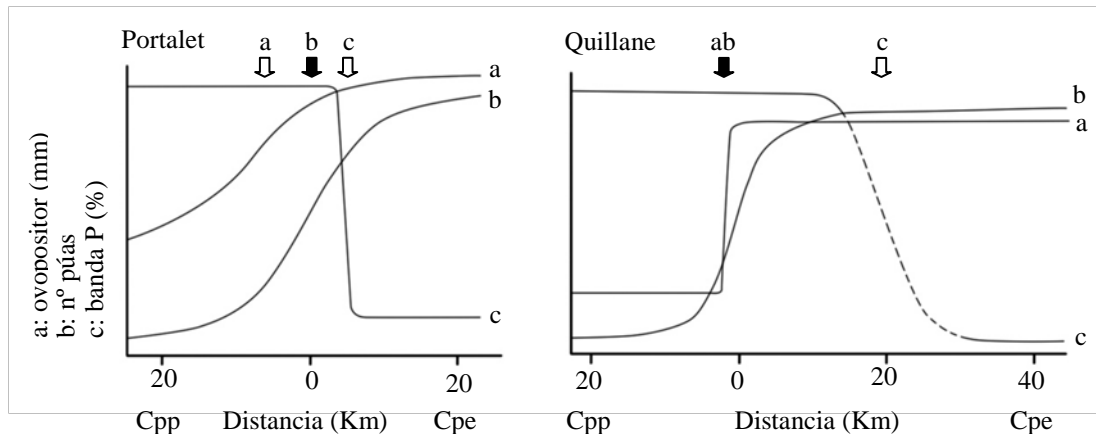


Figura 2.4.1. Clinas en la zona híbrida de *C. parallelus* en Pirineos. Algunas de las clinas más significativas estudiadas en dos zonas de contacto diferentes. El número de púas (b) está considerado como el mejor carácter para definir el centro de la zona híbrida y las clinas de muchos otros caracteres son coincidentes con él. Sin embargo, algunos caracteres están desplazados como es el caso de la longitud del ovopositor (a) en Portalet o la banda de heterocromatina constitutiva (c) en ambas zonas de contacto. Las flechas negras marcan el centro de la zona híbrida mientras que las blancas representan el centro de las clinas de otros caracteres. La imagen ha sido modificada de Ferris *et al.*, 1993.

de la Cornisa Cantábrica (Bella *et al.*, 2007). La clina que dibuja la banda P es muy estrecha; la frecuencia de esta banda varía de prácticamente un 100% a casi un 0% en apenas 1 Km, lo que refleja que está sujeta a una fuerte selección.

Es interesante la actividad del NOR a lo largo de la zona híbrida. Éste está activo en el 100% de los individuos Cpp mientras que Cpe carece él. Sin embargo, no se expresa en el 100% de los individuos híbridos que lo poseen y, cuando se expresa, lo hace de una forma variable de unas células a otras dentro de un mismo individuo (Buño *et al.*, 1994; Serrano, 1994). En cruzamientos realizados en laboratorio, esta desregulación de la actividad del NOR se relacionó con la esterilidad observada en los machos (Bella *et al.*, 1990; Virdee & Hewitt, 1992). Sin embargo, los híbridos de poblaciones naturales no muestran ningún grado de esterilidad indicando que la selección puede haber amortiguado los efectos de la expresión variable del NOR asociado al cromosoma X de Cpp. Esto constituiría un ejemplo de modificación de una zona híbrida. El proceso de modificación suele producir alelos raros que sólo se encuentran dentro de la zona híbrida modificada (Schilthuisen & Lammers, 2013). A este respecto, se ha descrito otra banda de heterocromatina constitutiva (banda H) del cromosoma sexual que sólo aparece dentro de la zona híbrida de *C. parallelus* en el Puerto de Portalet (Serrano *et al.*, 1996).

Recientemente, ciertos marcadores nucleares microsatélites previamente descritos por Wiesner *et al.* (2011) se han mostrado como una buena herramienta, de gran resolución, para el estudio de la estructura genética de las poblaciones de *C. parallelus* en su zona híbrida del Pirineo. En este estudio preliminar los individuos analizados han resultado ser muy polimórficos para estos microsatélites, a la vez que han confirmado la estructuración de las poblaciones de *C. parallelus* según la probable constitución genética de sus ancestros en puras para una u otra subespecie o híbridas, poniendo de manifiesto la condición de zona híbrida unimodal de este modelo (Sarasa, 2013).

Por último, se han estudiado los patrones de la disfunción testicular en la zona híbrida mediante cruzamientos experimentales (Virdee & Hewitt, 1994; Shuker *et al.*, 2005). Los resultados apuntan a que las clinas de la esterilidad detectada en los machos son compatibles con la existencia de interacciones entre varios *loci* del tipo DM (apartado [1.2](#)). Además, parece ser que estos *loci* presentan alelos derivados neutros o

ligeramente seleccionados dentro de cada subespecie, pero que causan esterilidad en los machos híbridos. Los centros de las clinas para estos *loci* coinciden con el centro de la zona híbrida, definido éste por el número de púas y el resto de caracteres morfológicos coincidentes.

WOLBACHIA COMO AGENTE EVOLUTIVO.

3.1 Breve descripción del género.

El género *Wolbachia* (Hertig & Wolbach, 1924) engloba a un diverso grupo de alfa-proteobacterias perteneciente al orden Rickettsiales. Son bacterias que infectan a un amplio número de especies de artrópodos y nematodos (Jeyaparakash & Hoy, 2000; Hilgenboecker *et al.*, 2008; Zug & Hammerstein, 2012). Su ciclo de vida se desarrolla de forma obligada en el citoplasma de las células de los hospedadores a los que infecta. Esto incluye la línea germinal transmitiéndose la infección principalmente de forma vertical mediante herencia materna (para una revisión del tema: Werren, 1997; Werren *et al.*, 2008; Saridaki & Bourtzis, 2010). Dentro del género pueden diferenciarse distintos supergrupos (A-K) en función de las secuencias del gen *16S rRNA* y de otros genes analizados (Werren *et al.*, 1995; Baldo *et al.*, 2006; Ros *et al.*, 2009).

3.2 Alteraciones producidas por *Wolbachia* e implicaciones evolutivas.

Wolbachia ha despertado un considerable interés en la comunidad científica debido a su capacidad de manipular la reproducción de sus hospedadores. Esta manipulación forma parte de su estrategia para extenderse y mantenerse en una población (para una revisión del tema: Werren *et al.*, 2008; Merçot & Poinot, 2009). Consiste en distintas alteraciones que incluyen la inducción de partenogénesis en hembras infectadas, la feminización de machos infectados que se comportan como hembras totalmente funcionales, la muerte selectiva de machos durante el desarrollo embrionario y la incompatibilidad citoplasmática entre el espermatozoide y el óvulo de individuos parentales con distinto estado de infección. Teniendo en cuenta que se transmite por vía materna, se comprende que todas estas alteraciones están enfocadas a

aumentar el éxito reproductivo de las hembras infectadas frente a las que no lo están. También se han descrito relaciones mutualistas de *Wolbachia* con especies de artrópodos, de carácter facultativo, y en especies de nematodos, de forma obligada. En los casos en los que esta relación tiene un carácter obligado, el hospedador no sobrevive sin la infección, comportándose la bacteria como un mutualista convencional (para una revisión del tema: Iturbe-Ormaetxe & Scott, 2007; Zug & Hammerstein, 2015).

La incompatibilidad citoplasmática (IC) es, con diferencia, la alteración más común producida por *Wolbachia* en sus hospedadores. Consiste en la reducción del número de descendientes viables en aquellos cruzamientos entre machos infectados y hembras no infectadas (IC unidireccional), o entre individuos infectados con distintas cepas (IC bidireccional). Aunque se desconocen los mecanismos que subyacen a la IC, hay un modelo aceptado que consiste en la “modificación” del esperma de los machos infectados pero, el cual puede ser “rescatado” en caso de fertilizar ovocitos infectados por la cepa adecuada (para una revisión del tema: Serbus *et al.*, 2008). Si no hay rescate del esperma infectado, el desarrollo embrionario se detiene. En varias especies infectadas por *Wolbachia*, se ha observado una asincronía entre los pronúcleos masculino y femenino durante las primeras divisiones embrionarias y que, finalmente, conducen al aborto del embrión (Reed & Werren, 1995; Lassy & Karr, 1996; Tram & Sullivan, 2002). Sin embargo, algunos estudios muestran discrepancias con el modelo propuesto y se han sugerido algunas alternativas (Bossan *et al.*, 2011).

En el contexto de la Biología Evolutiva, es evidente el interés que despiertan las posibles consecuencias que los efectos inducidos por *Wolbachia* pueden tener sobre la evolución de las especies a las que infecta (para una revisión del tema: Werren, 1997; Werren *et al.*, 2008). Se ha propuesto que *Wolbachia* puede generar una barrera de aislamiento reproductivo que conduzca a la especiación por infección (Werren, 1998; Wade, 2001; Telschow *et al.*, 2005a; Telschow *et al.*, 2007; Brucker & Bordenstein, 2012). Existen datos empíricos que avalan la capacidad de *Wolbachia* para producir especiación. Por ejemplo, se ha demostrado que la IC inducida por *Wolbachia* es uno de los principales factores que contribuyen al aislamiento reproductivo existente entre varias especies de *Nasonia* (Bordenstein *et al.*, 2001). En otros estudios, se ha demostrado que los efectos inducidos por esta bacteria pueden influir en la estructura genética de las poblaciones infectadas. Por ejemplo, se ha observado la reducción de la variabilidad en el ADN mitocondrial en poblaciones infectadas, debido a que el ADN

mitocondrial y la bacteria comparten el mismo patrón de herencia materna o citoplasmática (Turelli *et al.*, 1992; Dean *et al.*, 2003; Narita *et al.*, 2006; Raychoudhury *et al.*, 2008; 2010). De este modo, aquellos mecanismos que expanden la infección por *Wolbachia* en la población provocan, al mismo tiempo, la expansión del tipo mitocondrial asociado y de todos aquellos factores citoplasmáticos presentes en el citoplasma de las hembras infectadas.

Por todo ello, *Wolbachia* ha sido objeto de estudio ya que podría reducir el flujo génico tanto directamente, mediante la IC bidireccional, como indirectamente estructurando genéticamente las poblaciones o promoviendo procesos de reforzamiento (Werren, 1998; Telschow *et al.*, 2005a; 2007; Brucker & Bordenstein, 2012). Dicho reforzamiento puede llegar a modificar el comportamiento del hospedador de tal manera que se evite el establecimiento de cruzamientos incompatibles mediante la elección de pareja (Vala *et al.*, 2004; Robinson, 2006; Jiggins & Hurst, 2011). Debido a las capacidades de *Wolbachia* descritas, se ha considerado a la bacteria como una posible herramienta en el control de plagas (para una revisión del tema: LePage & Bordenstein, 2013), e incluso hay quien la ha relacionado con una patología humana (Chen *et al.*, 2015).

3.3 Modelos de la dinámica de la infección por *Wolbachia*.

Existen diferentes modelos teóricos que tratan de explicar la dinámica de la infección en una población hospedadora (Caspari & Watson, 1959; Turelli, 1994; Frank, 1998; Telschow *et al.*, 2005b; Vautrin *et al.*, 2007; Martínez-Rodríguez *et al.*, 2014). Cuando *Wolbachia* induce IC, todos los modelos comparten tres variables fundamentales: el nivel de IC inducido por una cepa determinada, el coste que le puede suponer a las hembras infectadas portar la bacteria, y la tasa de transmisión de la infección de las madres a sus progenies. Los modelos más básicos utilizan estas tres variables para predecir las frecuencias de individuos infectados y no infectados en un equilibrio estable (Turelli, 1994). Otros modelos tienen en cuenta factores como la migración desde poblaciones cercanas, y que podría influir en las frecuencias de infección (Telschow *et al.*, 2005b); o las variaciones en las frecuencias de infección que

otros factores, como la temperatura, pueden provocar en las poblaciones infectadas (Martínez-Rodríguez *et al.*, 2014).

El nivel de IC, el coste de la infección y su tasa de transmisión pueden verse afectados por la biología de *Wolbachia* y su interacción con el hospedador (para una revisión del tema: Werren, 1997; Werren *et al.*, 2008). El grado de IC asociado a los cruzamientos puede verse influenciado por el tipo de cepa, por la densidad de bacterias en el individuo infectado o por la interacción entre los genotipos del huésped y de la bacteria. Dichos factores pueden provocar que, en un cruzamiento incompatible, haya una fracción más o menos grande de los huevos que escapen de los efectos de la bacteria, y dan origen a individuos adultos. Por otra parte, teóricamente las hembras infectadas pueden incurrir en un coste energético adicional por el hecho de portar la bacteria, lo que podría mermar su fecundidad con respecto a la de las hembras no infectadas y traducirse en una producción de huevos menor o de peor calidad, aunque hay datos contradictorios a este respecto (Jiggins & Hurst, 2011; Zug & Hammerstein, 2015). Finalmente, la eficacia de la transmisión vertical suele variar entre el 90% y el 100% de la descendencia. De nuevo, la transmisión está muy ligada a la densidad de la bacteria en el huésped.

La ventaja que podría suponerle a una hembra infectada el hecho de no ver su progenie reducida dependiendo de la infección del macho puede desaparecer si la frecuencia de machos infectados es muy baja. Si existe un coste en supervivencia o en fecundidad, una hembra infectada podría verse en desventaja frente a una hembra no infectada. Por tanto, la reducción de la fecundidad tiene una gran importancia, sobre todo en los orígenes de la infección en una población (Turelli, 1994). Esta ventaja dependiente de frecuencia de infección creará un umbral por debajo del cual la infección decrece, tendiendo a desaparecer, mientras que por encima de ese umbral la infección aumentará. En una población donde coexistan dos tipos bacterianos que presenten IC bidireccional, se establecerá una competencia entre dichos tipos imponiéndose en la población aquella cepa que sea capaz de aumentar su frecuencia antes que la otra. Una vez que un tipo bacteriano sea mayoritario, tenderá a desplazar al segundo.

En este contexto, se establecen equilibrios que pueden ser estables o inestables (Frank, 1998). En los equilibrios estables, las pequeñas variaciones de frecuencias serán

amortiguadas, mientras que los equilibrios inestables se comportarán como umbrales. Los modelos matemáticos predicen la dinámica de la infección en distintas situaciones y permiten determinar las frecuencias requeridas para que persista la infección. De esta forma, se puede comprobar que: en una población con dos tipos de infección, la coexistencia de ambos tipos bacterianos sólo perdurará si existen individuos coinfectados; o, alternativamente, si existe un flujo migratorio que mantenga el polimorfismo de la infección (Turelli, 1994; Frank, 1998; Telschow *et al.*, 2005b; Atyame *et al.*, 2015). La coinfección en su origen sólo es posible mediante transmisión horizontal o herencia por vía paterna. A este respecto, cabe decir que ambos sucesos se dan en la naturaleza, aunque con baja frecuencia (para una revisión del tema: Werren, 1997; Werren *et al.*, 2008; Kremer & Huigens, 2011).

3.4 *Wolbachia* y *C. parallelus*.

Hace algunos años se detectó la infección por *Wolbachia* en *C. parallelus* por parte del grupo de Genética de la Universidad Autónoma de Madrid donde se ha desarrollado esta tesis. Algo más tarde se comunicó la presencia de *Wolbachia* en *C. parallelus* por un grupo diferente que analizaban la comunidad bacteriana del tubo digestivo de distintas especies de saltamontes (Dillon *et al.*, 2008). Mientras tanto, ya se habían iniciado una serie de trabajos para determinar la influencia que la infección podría tener o haber tenido sobre la zona híbrida de *C. parallelus*. Es en este contexto donde se ha desarrollado esta tesis doctoral que, a su vez, se ha reflejado en varias publicaciones y que se anexan al final del manuscrito (Zabal-Aguirre *et al.*, 2010; 2014; Bella *et al.*, 2010).

La infección de *Wolbachia* en *C. parallelus* se ha podido visualizar a nivel citológico mediante técnicas de microscopía de fluorescencia (Martínez *et al.*, 2009), y se ha descartado la influencia de otros simbioses como *Spiroplasma* o *Cardinium* sobre el saltamontes (Martínez-Rodríguez *et al.*, 2013). Por otra parte, otras técnicas citogenéticas han permitido detectar ciertos efectos de la bacteria durante la meiosis de los machos de *C. parallelus* (Sarasa, 2013; Sarasa *et al.*, 2013), como son el aumento de la tasa de entrecruzamiento y una mayor producción de espermátidas aberrantes (especialmente si los individuos son, además, híbridos). También, se ha abordado la

diversidad y la filogeografía de las cepas de *Wolbachia* que infectan al saltamontes, los posibles mecanismos de transferencia horizontal o la influencia de factores como la temperatura sobre la infección (Martínez-Rodríguez, 2013; Martínez-Rodríguez *et al.*, 2014). Los estudios más recientes han detectado transferencia lateral de material genético desde la bacteria al núcleo del ortóptero lo que parece indicar que la relación de *Wolbachia* con *C. parallelus* es bastante antigua (Funkhouser-Jones *et al.*, pendiente de publicación). Todos estos resultados se irán discutiendo a lo largo del presente trabajo, de acuerdo con los objetivos que se plantean en esta tesis.

OBJETIVOS

La presencia de *Wolbachia* en *C. parallelus* genera la hipótesis de que la infección esté influyendo o haya podido influir en la formación y dinámica de la zona híbrida que el ortóptero forma en los Pirineos. Para contrastar dicha hipótesis se han propuesto varios objetivos:

1. Detectar la infección de *Wolbachia* en *C. parallelus* y determinar las distintas cepas implicadas.
2. Analizar las frecuencias de infección en poblaciones dentro y fuera de la zona híbrida.
3. Describir las características generales de la infección.
4. Analizar la variación temporal de las frecuencias de infección en algunas poblaciones de referencia.
5. Determinar si existen patrones de infección, y si estos difieren entre las subespecies *C. p. parallelus* y *C. p. erythropus*.
6. Analizar la distribución de la infección a lo largo de un transecto de la zona híbrida en Pirineos, previamente estudiado para otros caracteres.
7. Determinar si *Wolbachia* influye en la fecundidad de las hembras.
8. Determinar si existe incompatibilidad citoplasmática inducida por *Wolbachia* en estos ortópteros.
9. Analizar la dinámica de la infección por *Wolbachia* en *C. parallelus*.
10. Determinar la posible relación entre la infección y los resultados obtenidos en estudios previos a la detección de *Wolbachia*, en esta zona híbrida.

MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Poblaciones muestreadas para el estudio de la infección por *Wolbachia*.

En la zona híbrida de Pirineos se eligió el transecto del Puerto de Portalet, que discurre a través de los valles transversales Vall d'Ossau, situado en la cara norte, y Valle de Tena, en la cara sur de la cordillera. Este transecto está situado en la parte central de los Pirineos y ha sido ampliamente estudiado para otras características en diversas ocasiones (apartado [2.4](#)). Con sus 25 Km cubre completamente la anchura de la zona híbrida e incluye, de norte a sur, las nueve poblaciones donde se recolectaron saltamontes: Gabas, L'Herminie, Refugio, Tourmont, Cabane de L'Araille, Portalet, Corral de Mulas, Sallent de Gállego y Escarrilla (Figura 4.1.1A). La población de Gabas, en Francia, se considera el límite norte de la zona híbrida encontrándose sólo individuos puros Cpp. El límite sur está establecido en la población de Escarrilla, donde

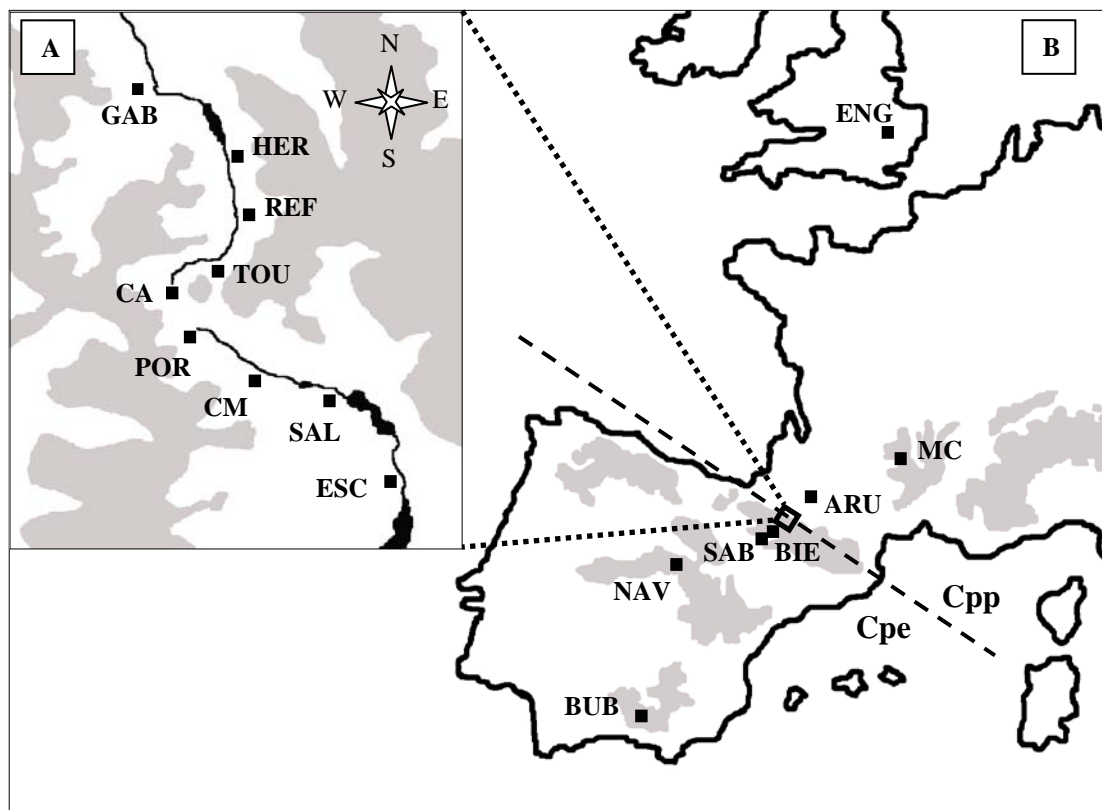


Figura 4.1.1. Mapa de las poblaciones muestreadas. A, poblaciones del transecto de la zona híbrida: Gabas (GAB), L'Herminie (HER), Refugio (REF), Tourmont (TOU), Cabane de L'Araille (CA), Portalet (POR), Corral de Mulas (CM), Sallent de Gállego (SAL) y Escarrilla (ESC). B, poblaciones puras localizadas fuera de la zona híbrida: Inglaterra (ENG), Massif Centrale (MC), Arudy (ARU), Biescas (BIE), Sabiñánigo (SAB), Navafría (NAV), Bubión (BUB).

todos los individuos presentan las características propias de la subespecie Cpe. Las montañas que flanquean el transecto superan los 2000 m en altura, de tal manera que los requerimientos de este saltamontes impiden el trasiego de individuos entre valles paralelos.

Fuera de la zona híbrida, se recolectaron individuos en poblaciones situadas a mayor o menor distancia (Figura 4.1.1B). Hacia el norte (Cpp), adentrándonos en Francia, encontramos las poblaciones de Arudy en los Pirineos y Massif Centrale en el sureste del país. Una tercera población se recolectó en el sur de Inglaterra. Hacia el Sur (Cpe), encontramos las poblaciones de Biescas y Sabiñánigo, aún en los Pirineos; Navafría, en el Sistema Central; y Bubión, en Sierra Nevada.

Se intentó que los muestreos se realizaran en las mismas fechas aunque respetando las condiciones de cada población (altura, latitud, precipitación, etc.) que modifican el periodo en el que este saltamontes se desarrolla y los tiempos de

Tabla 4.1.1. Poblaciones muestreadas.

Población	Coordenadas	Año de muestreo					Total
		2002	2003	2004	2005	2006	
Inglaterra (RU/Cpp)	44° 28' 43,65" N; 3° 45' 35,56" E	15	-	-	-	-	15
Massif Central (Fr/Cpp)	51° 39' 36,01" N; 0° 03' 0,03" E	10	-	-	-	-	10
Arudy (PFr/Cpp)	43° 5' 57,40" N; 0° 26' 42,88" O	-	99	-	102	100	301
Gabas (PFr/Cpp)	42° 53' 38,01" N; 0° 25' 48,02" O	93	109	-	111	91	404
L'Hermine (PFr/H)	42° 51' 32,65" N; 0° 23' 25,56" O	-	-	-	95	92	187
Refugio (PFr/H)	42° 50' 9,41" N; 0° 23' 6,51" O	-	-	-	107	106	213
Tourmount (PFr/H)	42° 49' 10,10" N; 0° 24' 22,33" O	-	128	-	100	96	324
Cabane de l'Araille (PFr/H)	42° 48' 48,15" N; 0° 25' 11,21" O	-	120	-	108	114	342
Portalet (PEs/H)	42° 47' 59,76" N; 0° 24' 55,02" O	101	131	111	162	198	703
Corral de Mulas (PEs/H)	42° 47' 7,15" N; 0° 23' 32,56" O	-	168	-	113	101	382
Sallent de Gállego (PEs/H)	42° 45' 53,31" N; 0° 20' 25,34" O	86	110	133	114	194	637
Escarrilla (PEs/Cpe)	42° 43' 57,05" N; 0° 18' 43,73" O	112	104	-	107	93	416
Biescas (PEs/Cpe)	42° 37' 9,55" N; 0° 19' 35,42" O	-	-	52	44	59	155
Sabiñánigo (PEs/Cpe)	42° 31' 14,73" N; 0° 20' 55,49" O	-	-	22	-	46	68
Navafría (SC/Cpe)	40° 59' 2,61" N; 3° 49' 00,38" O	104	81	-	285	-	470
Bubión (SN/Cpe)	36° 57' 1,82" N; 3° 21' 22,89" O	-	-	53	-	-	53

Fr, Francia; PFr, Pirineo francés; PEs, Pirineo español; RU, Reino Unido. Las coordenadas son sobre una proyección cilíndrica simple con el datum de referencia WGS84.

maduración. Algunas de las poblaciones se han muestreado más de un año para observar el comportamiento de la infección a lo largo del tiempo, especialmente las poblaciones de Gabas, Portalet, Sallent de Gállego y Escarrilla. En el resto de poblaciones se ha realizado un menor esfuerzo ya que el objetivo era determinar la infección en zonas remotas o añadir más puntos en el transecto de la zona híbrida, con el fin de establecer las clinas de la infección. Se han analizado aproximadamente un total de 4700 individuos. En la Tabla 4.1.1 se pueden consultar los tamaños de muestra y la localización de las distintas poblaciones. En todas las poblaciones se recolectaron individuos machos y hembras en número lo más equilibrado posible (Anexo I).

4.2 Preparación del material y extracción del ADN.

Los individuos muestreados se mantuvieron vivos hasta el momento en el que se diseccionaron, en condiciones de esterilidad, para extraer las gónadas. Tras su obtención, ovarios y testículos fueron conservados a -20 °C en tubos estériles independientes con etanol 100%. Transcurrido algún tiempo se renovó el etanol absoluto con el objetivo de retirar el agua extraída de las gónadas. Una vez asegurada la completa deshidratación, el material se mantuvo a - 20 °C hasta el momento de la obtención del ADN.

La extracción del ADN a partir de las gónadas se realizó mediante el método estándar de fenol-cloroformo. La gónada fue homogeneizada en tubos estériles individuales con 300 µl o 600 µl de tampón de lisis TNES (tris-HCl 50mM pH 8,25; NaCl 50 mM; EDTA 50 mM; SDS 1 %) dependiendo de si se trataba de testículos u ovarios, respectivamente. La suspensión se incubó con proteinasa K toda la noche a 37 °C. Tras el proceso de lisis se añadió a cada muestra un volumen de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25: 24: 1) homogeneizando la mezcla resultante con inversiones suaves durante 1 minuto. Mediante la centrifugación a 8.000 r.p.m. durante 10 min a 4 °C, se separó la fase acuosa (ADN) de la orgánica (proteínas y lípidos). Al sobrenadante recuperado (fase acuosa) se le añadió un volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (24: 1) para obtener un ADN lo más limpio posible. Tras homogeneizar y centrifugar como ya se ha explicado, se recuperó el sobrenadante. Se precipitó el ADN de la solución obtenida añadiendo un volumen de etanol absoluto a - 20 °C, mezclando

suavemente por inversión y dejando la mezcla resultante a - 20 °C durante toda la noche. Tras este periodo se centrifugó a 10.000 r.p.m. durante 20 min para obtener la mayor cantidad de ADN posible. El material precipitado se lavó con etanol al 70 % v/v y se secó a temperatura ambiente. Tras el secado, el ADN fue resuspendido en tampón tris-EDTA (TE) (tris-HCl 1 mM pH 8,0; EDTA 1 mM pH 8,0). El ARN presente en la muestra se digirió mediante la adición de RNasa H, incubándose durante 1 h a 37 °C. Las muestras se conservaron a - 20 °C hasta el momento de ser analizadas.

4.3 Caracterización de *Wolbachia* mediante PCR, secuenciación y análisis filogenético.

Para detectar la presencia de la bacteria en los extractos de ADN se usó la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, en sus siglas del inglés *Polymerase Chain Reaction*). Dicha reacción se llevó a cabo mediante unos cebadores que amplifican un fragmento de aproximadamente 1400 pares de bases (pb) del gen *16S rRNA* de *Wolbachia*. Estos cebadores estaban ya descritos en la literatura (Giordano *et al.*, 1995) y tienen como secuencia: 5'-AYT TTG AGA GTT TGA TCC TG-3', para el 21F; y 5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3', para el 1492R. Cada mezcla de reacción contenía una cantidad de 200 ng de ADN, 5 µl del tampón de la reacción a 10x, 1,5 mM de Cl₂Mg, 0,2 mM dNTPs (para cada uno de los nucleótidos), 30 pmol de cada cebador y 1 U de Taq polimerasa de ADN en un volumen final de 50 µl. Las condiciones de la PCR consistieron en 3 min a 95 °C seguidos de 30 ciclos de 30 s a 95 °C, 1 min a 54 °C y 2 min a 72 °C, más un ciclo final de 10 min a 72 °C.

Un total de 50 fragmentos amplificados, procedentes de distintas poblaciones representativas (Inglaterra, Arudy, Gabas, Portalet, Escarrilla y Navafría), fueron purificados mediante columnas (GFX PCR DNA Purification Kit, Amersham Biosciences, Freiburg, Germany) y secuenciados, utilizando los mismos cebadores que en la amplificación, en un secuenciador Applied Biosystems 3730 Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Las cadenas de sentido de lectura positivo y negativo fueron alineadas mediante ClustalX 1.83 (Thompson *et al.*, 1997), realizándose, posteriormente, una inspección manual y, cuando fue necesario, la edición de las secuencias mediante el programa BioEdit v7.0.5 (Hall, 1999). Aquellas secuencias que presentaron dobles picos en sus cromatogramas, debido a la presencia de

más de una cepa bacteriana, fueron descartadas. Se obtuvieron las secuencias consenso para cada fragmento secuenciado y se determinaron las distintas variantes. Las distintas secuencias así obtenidas fueron identificadas y depositadas en la base de datos GenBank con los números de acceso FJ438533, FJ438534, FJ438535, FJ438536, FJ438537 y FJ438538 (Tabla 4.3.1).

Tabla 4.3.1. Secuencias utilizadas para obtener la filogenia.

Especie hospedadora	Orden	Supergrupo	Número de acceso
<i>Drosophila sechellia</i>	Diptera	A	U17059
<i>Muscidifurax uniraptor</i>	Hymenoptera	A	L02882
<i>Diabrotica virgifera</i>	Coleoptera	A	U83098
<i>Culex pipiens</i>	Diptera	B	X61768
<i>Nasonia giraulti</i>	Hymenoptera	B	M84689
<i>Gryllus integer</i>	Orthoptera	B	U83094
<i>Gryllus pennsylvanicus</i>	Orthoptera	B	U83090
<i>Dirofilaria immitis</i>	Spirurida	C	AF487892
<i>Dirofilaria repens</i>	Spirurida	C	AJ276500
<i>Onchocerca gibsoni</i>	Spirurida	C	AJ276499
<i>Onchocerca gutturosa</i>	Spirurida	C	AJ276498
<i>Brugia malayi</i>	Spirurida	D	AF051145
<i>Litomosoides sigmodontis</i>	Spirurida	D	AF069068
<i>Folsomia candida</i>	Colembola	E	AF179630
<i>Mesaphorura macrochaeta</i>	Colembola	E	AJ422184
<i>Rhinocyllus conicus</i>	Coleoptera	F	M85267
<i>Kaloterme flavicollis</i>	Isoptera	F	Y11377
<i>Microcerateme sp.</i>	Isoptera	F	AJ292347
<i>Mansonella ozzardi</i>	Spirurida	F	AJ279034
<i>Mansonella perstans</i>	Spirurida	F	AY278355
wCpar_01	Orthoptera	B	FJ438533
wCpar_02	Orthoptera	B	FJ438534
wCpar_03	Orthoptera	F	FJ438535
wCpar_04	Orthoptera	F	FJ438536
wCpar_05	Orthoptera	F	FJ438537
wCpar_06	Orthoptera	F	FJ438538

Buscando secuencias homólogas mediante el programa BLAST (Zhang *et al.*, 2000) se obtuvieron otras secuencias del gen *16S rRNA* de *Wolbachia*, algunas de las cuales (Tabla 4.3.1) fueron utilizadas para el análisis filogenético. Con 20 de las secuencias existentes encontradas en las bases de datos y las 6 obtenidas en las poblaciones analizadas, se obtuvo un alineamiento de 1208 pb tras eliminar las colas que no solapaban a fin de obtener fragmentos de igual longitud. El árbol filogenético se construyó mediante inferencia bayesiana usando el programa MrBayes 3.1 (Ronquist y Huelsenbeck, 2003). El modelo de sustitución nucleotídica utilizado correspondió al de HKY + G (Hasegawa, Kishino y Yano 1985 con distribución gamma), el cual fue seleccionado mediante el programa Modeltest v3.7 (Posada y Crandall, 1998), siguiendo el criterio de las razones jerárquicas de verosimilitud. Se lanzaron dos análisis paralelos e independientes, cada uno de ellos con cuatro cadenas, alcanzándose la convergencia y la topología definitiva tras 200.000 generaciones. En el transcurso del análisis se muestrearon topologías transitorias cada 100 generaciones, dando un total de 4.000 árboles. El 25% de los árboles obtenidos se desecharon (las 1000 primeras topologías). Con los 3.000 árboles restantes se estimó la topología consenso según la regla de la mayoría del 50% y sus probabilidades bayesianas posteriores.

Se han calculado los tiempos de divergencia entre las distintas cepas presentes en el ortóptero asumiendo que la tasa de mutación de *Wolbachia* debe de ser similar a la encontrada en otras bacterias infectivas de vida intracelular obligada. Ésta varía entre el 1% y el 2% de sustituciones por 50 Ma (Moran *et al.*, 1993; Kuo & Ochman, 2009). El árbol filogenético de las distintas cepas se ha obtenido mediante inferencia bayesiana usándose el programa BEAST v1.8.1 (Drummond *et al.*, 2012). El modelo de sustitución nucleotídica empleado ha sido el HKY. Se han generado 1.000.000 de generaciones muestreándose cada 100 lo que resulta en una distribución posterior formada por 10.000 árboles. De estos, el 10% se han descartado como *burnin* ya que corresponden a los árboles obtenidos en las primeras generaciones, antes de alcanzarse la fase estacionaria. El árbol consenso resultante ha sido calibrado bajo las hipótesis del reloj molecular estricto y del reloj molecular relajado.

4.4 Discriminación entre los distintos tipos de infección mediante PCR.

El análisis filogenético realizado indicó la presencia de cepas bacterianas pertenecientes a los supergrupos B y F de *Wolbachia* descritos en la literatura. Para identificar los distintos tipos de infección se utilizó la técnica de la PCR anidada. Esta técnica consiste en una primera amplificación general con cebadores “externos”, seguida de una segunda amplificación a partir del producto obtenido mediante unos cebadores “internos”, que son capaces de discriminar entre las distintas variantes posibles. Esta segunda ronda de amplificación específica resulta muy apropiada en la detección de endoparásitos como *Wolbachia*, ya que incrementa la especificidad y evita falsos negativos derivados de una baja densidad bacteriana. Para la amplificación general se utilizaron los cebadores anteriormente descritos mientras que los cebadores internos fueron diseñados a partir de los fragmentos obtenidos en la secuenciación. La combinación de los cebadores F6 (5'-GTG AAG AAG GCC TTT GGG TTG TA-3') y R10B (5'-GAT TAG CTT AGG CTT GCG CAC C-3') permite la amplificación del supergrupo B a partir del fragmento general. Por otro lado, el par formado por los cebadores F6 y R11 (5'-GAT TAG CTT AGC CTC GCG ACT T-3') permite la discriminación del supergrupo F. Así pues, cada ADN fue sometido a tres reacciones de PCR: una general y otras dos (B y F) discriminantes de supergrupo.

Las reacciones de PCR usadas para discriminar entre supergrupos amplificaron fragmentos de unos 850 pb. Las mezclas de reacción requeridas para obtener dichos fragmentos fueron iguales a las descritas para la amplificación general excepto en que se añadió 1 µl del producto de PCR obtenido en la primera ronda de amplificación en vez de los 200 ng de ADN genómico. Las condiciones de amplificación consistieron en 3 min a 95 °C seguidos de 30 ciclos de 30 s a 95 °C, 1 min a 61 °C y 1 min a 72 °C, más un tramo final de 10 min a 72 °C.

La validez del procedimiento se verificó mediante controles en los que se intentaron amplificar otras bacterias relacionadas como *Rickettsia sp.*, *Rhizobium sp.*, *Pseudomonas fluorescens* o *Escherichia coli*, así como ADN de pollo, pavo y humano. En ninguno de los casos se obtuvieron resultados positivos. Además, se comprobó que la reacción de PCR específica del supergrupo B era negativa para la amplificación del supergrupo F y viceversa. Para este control interno, se utilizaron los amplicones obtenidos de aquellos individuos infectados por B o por F, que habían sido

secuenciados y que no mostraron dobles picos en los correspondientes cromatogramas. En todas las reacciones de PCR se incluyó un control positivo con el ADN de un individuo infectado y un control negativo o “blanco” sólo con agua.

4.5 Análisis estadísticos realizados para el estudio de la distribución de la infección.

- *Diferencias en la infección entre sexos.*- Se comparó la incidencia de la infección entre machos y hembras, en el total de las 45 muestras analizadas (diferentes en localización y/o año de captura), mediante la distribución de las frecuencias absolutas en tablas de doble entrada. Los criterios para la clasificación de los individuos de cada población fueron el sexo (machos y hembras) y el tipo de infección (no infectado, infectado B, infectado F y coinfectado). Sobre estas tablas se calcularon los ratios de máxima verosimilitud y se estableció el nivel de significación usando el test G. Al repetirse el test 45 veces, se aplicó la corrección de Bonferroni para determinar el valor crítico corregido para la significación de cada test individual. Así pues, para un intervalo de confianza del 95 %, la probabilidad crítica para rechazar la hipótesis nula se fijó en $\alpha = 0,001$.

- *Diferencias en la infección de las poblaciones a lo largo del tiempo.*- Para la detección de variaciones en las frecuencias de los tipos de infección a lo largo de 4 generaciones (2002-2006) se construyeron tablas de contingencia para varias poblaciones. Así pues, los individuos de las poblaciones de Gabas, Portalet, Sallent de Gállego y Escarrilla fueron clasificados según su tipo de infección y año de captura. Sobre las tablas de contingencia se aplicó de nuevo el test G. El intervalo de confianza fijado para rechazar la hipótesis nula fue del 95%, fijándose la probabilidad crítica en $\alpha = 0,05$.

- *Análisis de los residuos tipificados corregidos de las tablas de contingencia.*- Tanto en el caso de las diferencias en la infección entre sexos como a lo largo del tiempo, se inspeccionaron los residuos tipificados corregidos de las tablas de contingencia en los test que hubiesen resultado significativos. De esta forma, se pudo determinar qué tipo de infección contribuía de manera más significativa a las diferencias observadas.

- *Determinación de los diferentes patrones de infección.*- Con las 45 muestras poblacionales para las que se determinaron las frecuencias de los tipos de infección, se realizó un análisis jerárquico de conglomerados. Para ello se consideró a cada muestra independiente del resto a pesar de su origen y año de captura. Se construyó una tabla de contingencia con las distribuciones de las frecuencias de los tipos de infección observadas en cada una de las 45 muestras. A partir de esta tabla de contingencia se calculó una matriz de distancias con los valores χ^2 obtenidos de la comparación entre todos los pares posibles. Con esta matriz de distancias se construyó un dendrograma usando distintos métodos como el del vecino más lejano. A partir de este dendrograma se determinaron los distintos patrones de infección posibles.

Con el fin de establecer de la manera más objetiva posible el número de patrones de infección diferentes, se siguieron otros criterios adicionales. En primer lugar, se procedió a representar gráficamente las distintas muestras sobre tres ejes de coordenadas, cada uno de los cuales representaba las frecuencias relativas de los tipos de infección B, F y BF (la clase de no infectados queda determinada por las otras tres). También se usó la tabla de contingencia original para aprovechar la propiedad del test G de descomponer la entropía total, observada a lo largo de las 45 muestras, en sus componentes atribuibles a las diferencias entre grupos o a la heterogeneidad dentro de grupos. Además, se realizó un análisis de la varianza molecular (AMOVA) para calcular los distintos componentes de la varianza distribuidos en los diferentes niveles jerárquicos de organización: dentro de las muestras, entre patrones, entre muestras dentro de los patrones. Para ello, se consideró la infección como un marcador citoplasmático dando origen a cuatro haplotipos (citotipos): no infectado, infectado B, infectado F, y coinfectado (BF). Así pues, se ha trabajado con las frecuencias de cuatro haplotipos, considerando las distancias entre ellos equidistantes, y siendo desconocidas las relaciones evolutivas que los conectan. De esta forma, se pudo evaluar el número crítico de grupos que maximizaba la diferencia entre patrones de infección y minimizaba la heterogeneidad dentro de ellos.

Finalmente, se constataron las diferencias existentes entre las distribuciones de las proporciones de los tipos de infección entre los distintos patrones resultantes mediante los test no paramétricos de Kruskal-Wallis, para más de dos muestras independientes, o la U de Mann-Whitney, para pares de muestras independientes. Previo

a la aplicación de estos últimos test, se comprobó que se cumplieran las condiciones de homocedasticidad (prueba de Levene).

Para evitar una excesiva influencia en los resultados de aquellas muestras con un número muy bajo de individuos, se repitió el análisis excluyendo aquellas con menos de 40 individuos o, en un tercer análisis, 80 individuos. De esta forma, al comparar entre los distintos resultados obtenidos se podría decidir entre la inclusión o no de las muestras peor caracterizadas.

Todos los análisis estadísticos fueron llevados a cabo mediante el uso del programa SPSS v15.0 a excepción del AMOVA. Este último se llevó a cabo mediante el programa Arlequin v3.5 (Excoffier & Lischer, 2010).

4.6 Diseño de los cruzamientos establecidos para determinar los efectos de *Wolbachia*.

Para analizar los efectos de *Wolbachia* en la reproducción de *C. parallelus* se recolectaron individuos procedentes de algunas de las poblaciones muestreadas. En una primera aproximación se intentó determinar la infección de los individuos antes de establecer los cruzamientos. Esta metodología requeriría la mutilación de los individuos para obtener el ADN necesario a partir de patas, principalmente. No obstante, este hecho podía afectar al comportamiento durante el apareamiento y, por tanto, a la capacidad reproductora de los individuos mutilados. Además, no se encontró una buena correlación entre la infección encontrada en las gónadas y la hallada en otros tejidos (datos no mostrados). Por lo tanto, los cruzamientos se tuvieron que establecer sin conocer *a priori* la infección de los parentales.

A principios de verano, se recogieron las larvas que se separaron según su sexo y procedencia. Machos y hembras se mantuvieron separados hasta que alcanzaron la madurez sexual. Desde julio a septiembre, cada hembra se cruzó con un sólo macho, y ambos se alojaron en una jaula al aire libre. De esta forma, se mantuvieron las condiciones de temperatura, humedad, luz, etc. lo más parecidas posibles a las condiciones naturales. Dentro de las jaulas los saltamontes disponían de hierba, agua y arena húmeda donde las hembras pudieran enterrar sus puestas. Todos los días se

proporcionaba hierba fresca, recogida del campo, y se revisaba la arena a fin de recoger y fechar las puestas que pudieran haber sido depositadas.

Tras la época de cruzamiento, los parentales de cada cruzamiento fueron diseccionados para extraer sus gónadas en condiciones de esterilidad. Dichas gónadas fueron conservadas en etanol absoluto hasta la extracción de ADN según los métodos descritos anteriormente. Las puestas fueron conservadas en arena húmeda a temperatura ambiente durante un mes para permitir el desarrollo de los embriones antes de ser éste interrumpido por una diapausa inducida. Este periodo de inactividad, que es obligado en esta especie de ortópteros, se simuló poniendo los recipientes de arena húmeda con las puestas a una temperatura de 4 °C durante 4 meses. Tras la diapausa, se colocaron a temperatura ambiente durante 15 días reactivándose así el desarrollo embrionario (Kelly-Stebbins & Hewitt, 1972). Se separaron los huevos de cada puesta y se diseccionaron a fin de determinar la ausencia o presencia de embrión. El número de puestas, huevos y embriones fueron anotados para cada cruzamiento.

Nuestros esfuerzos se han centrado en determinar la influencia de *Wolbachia* en el flujo génico entre ambas subespecies a través de la zona híbrida. En este sentido, se establecieron 163 cruzamientos con individuos procedentes de la población de Portalet. Esta población se encuentra situada en el centro geográfico del transecto Vall d'Ossau-Valle de Tena, en la zona híbrida de Pirineos (Figura 4.1.1). Por otra parte, el análisis de las frecuencias de infección había mostrado que en Portalet se encontraban todos los tipos de infección representados de forma bastante equilibrada (ver más adelante en la sección de Resultados). Así pues, la elección de esta población maximizaba la probabilidad de encontrar todos los tipos de cruzamientos respecto de la infección de los parentales. El número de cruzamientos efectivos se redujo a 123 debido a diferentes causas que escaparon a nuestro control (parasitismo, enfermedades, etc.) y que interrumpieron la producción de puestas antes de tiempo. Tras realizar un análisis exploratorio de datos se descartaron aquellos cruzamientos que produjeron menos de 20 huevos y 3 puestas con el objetivo de excluir del estudio aquellos cruzamientos mal caracterizados. Se evita así que la determinación de un cruzamiento recaiga en 1 o 2 puestas que pudieran haber sufrido alguna contingencia, afectando a todos los huevos de dicha puesta por igual (dsecación, infección por hongos, etc.). Esto supuso una reducción del 10% de los cruzamientos efectivos arrojando una cifra final de 110

cruzamientos estables y bien caracterizados, realizados con individuos híbridos de Portalet.

También se realizaron cruzamientos con individuos puros *C. p. parallelus* y *C. p. erythropus* procedentes de Gabas y Escarrilla, respectivamente. Estas poblaciones constituyen los extremos del transecto Vall d'Ossau-Valle de Tena. Se establecieron un total de 40 cruzamientos entre individuos puros como control de la influencia que pudieran tener las diferencias en la composición genética en la producción de huevos, puestas y/o embriones. Al inicio se contaba con 10 cruzamientos para cada tipo posible ($\text{♀C}_{pp} \times \text{C}_{pp} \text{ ♂}$, $\text{♀C}_{pp} \times \text{C}_{pe} \text{ ♂}$, $\text{♀C}_{pe} \times \text{C}_{pe} \text{ ♂}$ y $\text{♀C}_{pe} \times \text{C}_{pp} \text{ ♂}$). Al final de la temporada se obtuvo un total de 31 cruzamientos efectivos ($N = 7$, $N = 8$, $N = 6$ y $N = 10$, respectivamente), todos ellos bien caracterizados.

Todos los cruzamientos se llevaron a cabo en un espacio cedido amablemente por el Ayuntamiento de Sallent de Gállego. Esta localidad se encuentra dentro del transecto Vall d'Ossau-Valle de Tena en la zona híbrida de Pirineos, muy cercana a las poblaciones donde se recolectaron los individuos utilizados para los cruzamientos. *C. parallelus* es, por tanto, muy común en la zona siendo uno de los últimos sitios donde desaparece el saltamontes al final de la temporada. Estas condiciones maximizaron el número de puestas obtenidas.

4.7 Análisis estadísticos realizados con los cruzamientos establecidos.

Los cruzamientos llevados a cabo se pudieron clasificar bajo diferentes criterios (Tabla 4.7.1): origen de los parentales (puros *C_{pp}*, puros *C_{pe}*, híbridos), tipo de infección de los parentales (*O_{xO}*, *O_{xB}*, *B_{xO}*, etc.) y susceptibilidad de sufrir incompatibilidad citoplasmática inducida por *Wolbachia* (compatibles, incompatibles unidireccionales e incompatibles bidireccionales).

Las variables analizadas fueron el número de puestas, el tamaño de las puestas (número de huevos por puesta), el número de huevos, el número de embriones y la proporción de embriones (número de embriones/número de huevos), siendo la unidad de análisis el cruzamiento. Sin embargo, son las tres últimas variables las que han

Tabla 4.7.1. Clasificación de los diferentes tipos de cruzamientos realizados.

Entre individuos híbridos					Entre individuos puros				
♀\♂	O	B	F	BF	♀\♂	O	B	F	BF
O	27	9	6	1	O	$\begin{smallmatrix} 1 & 2 \\ 4 & 8 & 1 \end{smallmatrix}$	-	-	$\begin{smallmatrix} 3 \\ - & 4 & - \end{smallmatrix}$
B	27	5	4	2	B	$\begin{smallmatrix} - & 1 & - \\ - & 1 & 1 \end{smallmatrix}$	$\begin{smallmatrix} 1 & - \\ - & 1 & - \end{smallmatrix}$	$\begin{smallmatrix} 1 & - \\ - & 1 & - \end{smallmatrix}$	$\begin{smallmatrix} - & 1 \\ - & 2 & 1 \\ - & 1 & 1 \end{smallmatrix}$
F	9	-	3	2	F	$\begin{smallmatrix} - & - & - \\ - & - & - \end{smallmatrix}$	$\begin{smallmatrix} - & - & - \\ - & - & - \end{smallmatrix}$	$\begin{smallmatrix} - & 1 \\ 1 & 5 & 3 \end{smallmatrix}$	$\begin{smallmatrix} - & 1 \\ 1 & 1 & - \end{smallmatrix}$
BF	8	5	2	-	BF	$\begin{smallmatrix} 2 & 2 & - \\ - & 2 & - \end{smallmatrix}$	$\begin{smallmatrix} 2 & 2 & - \\ - & 2 & - \end{smallmatrix}$	$\begin{smallmatrix} - & 1 & - \\ 1 & 1 & - \end{smallmatrix}$	$\begin{smallmatrix} - & 3 & 1 \\ 1 & 3 & 1 \end{smallmatrix}$

<div></div>	Compatibles
<div></div>	Incompatibles bidireccionales
<div></div>	Incompatibles unidireccionales

a

b

c

d

T

♀

♂

a: Cpp x Cpe
b: Cpp x Cpp
c: Cpe x Cpe
d: Cpe x Cpp
T: suma de a, b, c y d

recibido una mayor atención a la hora de detectar los efectos de *Wolbachia* en la reproducción de *C. parallelus*.

En algunas ocasiones se ha comprobado que *Wolbachia* compromete los recursos vitales de las hembras a las que infecta alterando su fecundidad (apartado 3.3). Se podría detectar esto en las hembras tanto por la cantidad de huevos que produzcan a lo largo de sus vidas (número de huevos), como por la calidad de estos (proporción de embriones), cuando no existan otros factores evidentes que puedan enmascararlo (utilizando, por ejemplo, cruzamientos entre hembras infectadas con machos no infectados y, por tanto, libres de sufrir incompatibilidad citoplasmática inducida por *Wolbachia*).

Por otra parte, los errores que se producen en las primeras divisiones mitóticas tras la fecundación, conllevan la detención del desarrollo embrionario en los huevos de aquellos cruzamientos que experimenten incompatibilidad citoplasmática inducida por *Wolbachia* (apartado 3.2). De esta forma, la IC estará relacionada con la proporción de embriones observada en cruzamientos susceptibles de incompatibilidad.

Analizando estas variables a través de los cruzamientos clasificados según los diferentes criterios especificados, se podrían detectar diferencias atribuibles al origen de los parentales o a la infección por *Wolbachia*, el papel de cada tipo bacteriano, etc. En todos los análisis realizados se comprobó que se cumpliera la condición de homocedasticidad mediante la prueba de Levene. También se determinó si las variables analizadas seguían o no una distribución normal mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov o Shapiro-Wilk, en el caso de tamaños de muestra pequeños. Dependiendo del sentido de las pruebas de normalidad, se realizaron los análisis mediante pruebas paramétricas (t de Student, para dos muestras independientes; ANOVA, para más de dos muestras independientes) o no paramétricas (U de Mann-Whitney, para dos muestras independientes; prueba de Kruskal-Wallis, para más de dos muestras independientes). El intervalo de confianza fijado para rechazar la hipótesis nula fue del 95% en todos los análisis, fijándose la probabilidad crítica en $\alpha = 0,05$.

Todos los análisis estadísticos fueron llevados a cabo mediante el uso del programa SPSS v15.0.

4.8 Modelo de la dinámica de la infección por *Wolbachia* en *C. parallelus*.

Para estudiar la dinámica de la infección se adaptó el modelo propuesto por Turelli (1994) a las características propias del estudio en *C. parallelus* (Figura 4.8.1). Dicho modelo se basa en tres variables fundamentales: el coste que puede suponerle a las hembras infectadas portar a la bacteria, el nivel de IC inducido por *Wolbachia* y la tasa de transmisión de la bacteria de las madres infectadas a sus descendencias (apartado [3.3](#)).

El modelo parte de ciertas asunciones:

- La probabilidad con que sucede cada tipo de cruzamiento obedece sólo a las frecuencias de infección que existen en la población.
- No existe migración, transmisión horizontal, ni paterna.
- La transmisión de los distintos tipos bacterianos es independiente.

Figura 4.8.1. Modelo la dinámica de la infección.

Variables:

- p_i ; frecuencia de infectados B (p_b), infectados F (p_f) y coinfectados (p_{bf}).
- q ; frecuencia de no infectados.
- H_{UNi} ; promedio de la proporción relativa de eclosión en los cruzamientos incompatibles unidireccionales (H_{UNib} , H_{UNif} y H_{UNibf} = H_{UNib} x H_{UNif} ; según la infección de la hembra involucrada) respecto de los cruzamientos compatibles ($H_0=1$).
- H_{BI} ; promedio de la proporción relativa de eclosión en los cruzamientos incompatibles bidireccionales respecto de los cruzamientos compatibles ($H_0=1$).
- F_i ; fecundidad de hembras infectadas por B (F_b), infectadas por F (F_f) y coinfectadas (F_{bf}) respecto de hembras no infectadas ($F_0=1$).
- μ_i ; fracción de huevos no infectados producidos por una hembra que porta la cepa B (μ_b) o la cepa F (μ_f).

Modelo:

				Tipo de descendencia producida				
				B	F	BF	O	
Tipo de cruzamiento	♀	♂	Frecuencia cruzamiento					
	B	x	B	$p_b^*p_b$	$F_b^*(1-\mu_b)$		$F_b^*\mu_b^*H_{UNib}$	
	B	x	F	$p_b^*p_f$	$F_b^*(1-\mu_b)^*H_{BI}$		$F_b^*\mu_b^*H_{UNif}$	
	B	x	BF	$p_b^*p_{bf}$	$F_b^*(1-\mu_b)^*H_{BI}$		$F_b^*\mu_b^*H_{UNibf}$	
	B	x	O	p_b^*q	$F_b^*(1-\mu_b)$		$F_b^*\mu_b$	
	F	x	B	$p_f^*p_b$		$F_f^*(1-\mu_f)^*H_{BI}$	$F_f^*\mu_f^*H_{UNib}$	
	F	x	F	$p_f^*p_f$		$F_f^*(1-\mu_f)$	$F_f^*\mu_f^*H_{UNif}$	
	F	x	BF	$p_f^*p_{bf}$		$F_f^*(1-\mu_f)^*H_{BI}$	$F_f^*\mu_f^*H_{UNibf}$	
	F	x	O	p_f^*q		$F_f^*(1-\mu_f)$	$F_f^*\mu_f$	
	BF	x	B	$p_{bf}^*p_b$	$F_{bf}^*(1-\mu_b)^*\mu_f$	$F_{bf}^*\mu_b^*(1-\mu_f)^*H_{BI}$	$F_{bf}^*(1-\mu_b)^*(1-\mu_f)$	$F_{bf}^*\mu_b^*\mu_f^*H_{UNib}$
	BF	x	F	$p_{bf}^*p_f$	$F_{bf}^*(1-\mu_b)^*\mu_f^*H_{BI}$	$F_{bf}^*\mu_b^*(1-\mu_f)$	$F_{bf}^*(1-\mu_b)^*(1-\mu_f)$	$F_{bf}^*\mu_b^*\mu_f^*H_{UNif}$
	BF	x	BF	$p_{bf}^*p_{bf}$	$F_{bf}^*(1-\mu_b)^*\mu_f^*H_{BI}$	$F_{bf}^*\mu_b^*(1-\mu_f)^*H_{BI}$	$F_{bf}^*(1-\mu_b)^*(1-\mu_f)$	$F_{bf}^*\mu_b^*\mu_f^*H_{UNibf}$
	BF	x	O	p_{bf}^*q	$F_{bf}^*(1-\mu_b)^*\mu_f$	$F_{bf}^*\mu_b^*(1-\mu_f)$	$F_{bf}^*(1-\mu_b)^*(1-\mu_f)$	$F_{bf}^*\mu_b^*\mu_f$
	O	x	B	q^*p_b				1^*H_{UNib}
	O	x	F	q^*p_f				1^*H_{UNif}
	O	x	BF	q^*p_{bf}				1^*H_{UNibf}
O	x	O	q^*q				1	

Para estimar el coste que puede suponerle a las hembras infectadas portar cada una de las cepas bacterianas, se ha calculado la razón entre la media de embriones producidos por las hembras con un determinado tipo de infección y la media de embriones producidos por las hembras no infectadas. Todas las hembras consideradas para esta estimación pertenecían a cruzamientos no susceptibles de sufrir IC inducida por *Wolbachia*, con el objetivo de que este efecto no influyera en el número de embriones observados. Estas estimas han sido asimiladas como la fecundidad relativa (F) de cada tipo de hembra clasificada según la infección que presentarán. A partir de esta fecundidad relativa se ha podido calcular el coste ($s_f = 1 - F$) que supone la infección por los distintos supergrupos bacterianos para las hembras de *C. parallelus*.

Para estimar los niveles de IC que induce *Wolbachia* en *C. parallelus*, se han utilizado las diferencias en las proporciones de embriones detectadas entre los distintos tipos de cruzamientos. De esta forma, se ha relativizado la media observada en un determinado tipo de cruzamiento susceptible a sufrir IC respecto de la proporción media de embriones observada en los cruzamientos compatibles. Los ratios obtenidos han sido asimilados como las tasas de eclosión (H) descritas en el modelo de Turelli (1994). Se ha podido así determinar el coste ($s_h = 1 - H$) que la IC inducida por *Wolbachia* origina sobre los distintos tipos de cruzamientos susceptibles de incompatibilidad.

Por último, el modelo contempla las tasas de transmisión vertical de los distintos supergrupos bacterianos ($1-\mu$, siendo μ la proporción de descendientes libres de infección producidos por una hembra infectada). Las tasas de transmisión se han inferido mediante simulaciones de la dinámica de infección que fueron realizadas a partir de los valores de las otras variables, estimados empíricamente.

4.9 Simulaciones de la dinámica de la infección por *Wolbachia* en *C. parallelus*.

Para una mayor solidez, se ha introducido incertidumbre en el modelo de la dinámica de infección. Así pues, se han calculado las distribuciones posteriores de los parámetros de fecundidad (F) y tasa de eclosión (H) mediante el programa OpenBGS (Lunn *et al.*, 2009). Dicho programa incluye un “sistema experto” que determina el esquema apropiado MCMC (de las siglas en inglés de Cadena Markov Monte Carlo), basado en el muestreo de Gibbs, para el análisis de un modelo especificado. Se

realizaron 100.000 iteraciones, siendo descartadas las 1.000 primeras para evitar valores no ajustados. Se han obtenido así distribuciones posteriores de 99.000 valores para el número y la proporción de embriones. En el caso del número de embriones producidos (F) se usó como modelo la distribución normal. Las distribuciones posteriores obtenidas para los diferentes tipos de hembras infectadas se dividieron por la distribución posterior obtenida de las hembras no infectadas (obteniendo así F_o , F_b , F_f , F_{bf}). En el caso de las proporciones de embriones (H) se usó como modelo la distribución beta. Las distribuciones posteriores de cada tipo de cruzamiento fueron divididas por la distribución obtenida para los cruzamientos compatibles (obteniendo así H_o , H_{UNib} , H_{UNIf} , H_{BI}). Se adoptaron probabilidades *a priori* uniformes partiendo así de una situación no informativa. Los intervalos de credibilidad al 95% se han calculado a partir de las distribuciones posteriores obtenidas.

Las distribuciones de la tasa de transmisión ($1 - \mu$) se han obtenido mediante la optimización, en el modelo propuesto, de los valores de μ necesarios para alcanzar un determinado estado de equilibrio en la dinámica de infección, dadas las distribuciones posteriores calculadas para H y F. Dicho estado de equilibrio se puede hacer corresponder con las frecuencias de infección observadas en alguna de las poblaciones estudiadas y que sea de nuestro interés.

Con los valores de μ obtenidos para cada cepa se ha podido evaluar la capacidad de la infección para mantenerse en una población: valores de μ comprendidos el intervalo $[0, 1]$, indicarían que la infección por *Wolbachia* sería capaz de mantener las frecuencias observadas dados los valores de H y F observados en los cruzamientos; valores fuera de ese intervalo, indicarían la necesidad de otros eventos como la migración, la transmisión horizontal o la transmisión paterna. Por otro lado, $\mu = 0$ indicaría que la transmisión de la bacteria es completa mientras que $\mu = 1$ indicaría ausencia de transmisión.

Por otra parte, se han realizado simulaciones con el fin de comprobar los requerimientos mínimos de cada cepa para extenderse en distintos escenarios (en una población no infectada o en una población previamente infectada con una cepa distinta). Estas simulaciones nos han permitido analizar la relación entre cepas así como las consecuencias que podría tener la dinámica de infección en la estructura de las poblaciones.

Para las simulaciones realizadas en el presente estudio se ha utilizado el programa R 2.10.1 (R Development Core Team, 2009). Para la optimización se ha usado la función `optim()` incluida en el paquete `{stats}` del mismo programa.

RESULTADOS

DESCRIPCIÓN DE LA INFECCIÓN.

5.1 Cepas de *Wolbachia* detectadas en *C. parallelus*.

Se han detectado seis variantes de la secuencia del gen *16S rRNA* de *Wolbachia* presentes en *C. parallelus* (*wCpar_01*, *wCpar_02*, *wCpar_03*, *wCpar_04*, *wCpar_05* y *wCpar_06*; Tabla 4.3.1). Habiéndose obtenido unas secuencias de 1305 pb de longitud, se han encontrado 51 posiciones variables que permiten clasificarlas en dos grupos. El primero de ellos incluye las secuencias *wCpar_01* y *wCpar_02* que presentan tan sólo dos posiciones diferentes entre sí; el segundo grupo incluye las secuencias *wCpar_03*, *wCpar_04*, *wCpar_05* y *wCpar_06*, con 13 posiciones variables. Dentro de los grupos la similitud es mayor del 99%, mientras que entre grupos es menor del 97% (Tabla 5.1.1).

Tabla 5.1.1. Matriz de identidad de las secuencias obtenidas del gen *16S rRNA*.

	wCpar_01	wCpar_02	wCpar_03	wCpar_04	wCpar_05	wCpar_06
wCpar_01	-	0,998	0,966	0,961	0,965	0,966
wCpar_02		-	0,967	0,963	0,967	0,967
wCpar_03			-	0,993	0,995	0,996
wCpar_04				-	0,990	0,991
wCpar_05					-	0,999
wCpar_06						-

El árbol filogenético obtenido mediante inferencia bayesiana, construido a partir de las secuencias detectadas en *C. parallelus* y las publicadas anteriormente por otros autores (alineamiento de 1208 pb), muestra que *wCpar_01* y *wCpar_02* pertenecen al supergrupo B de *Wolbachia* mientras que *wCpar_03*, *wCpar_04*, *wCpar_05* y *wCpar_06* están dentro del supergrupo F (Figura 5.1.1). Las probabilidades bayesianas posteriores que apoyan los nodos de los supergrupos B y F son del 100% y del 80-87%, respectivamente.

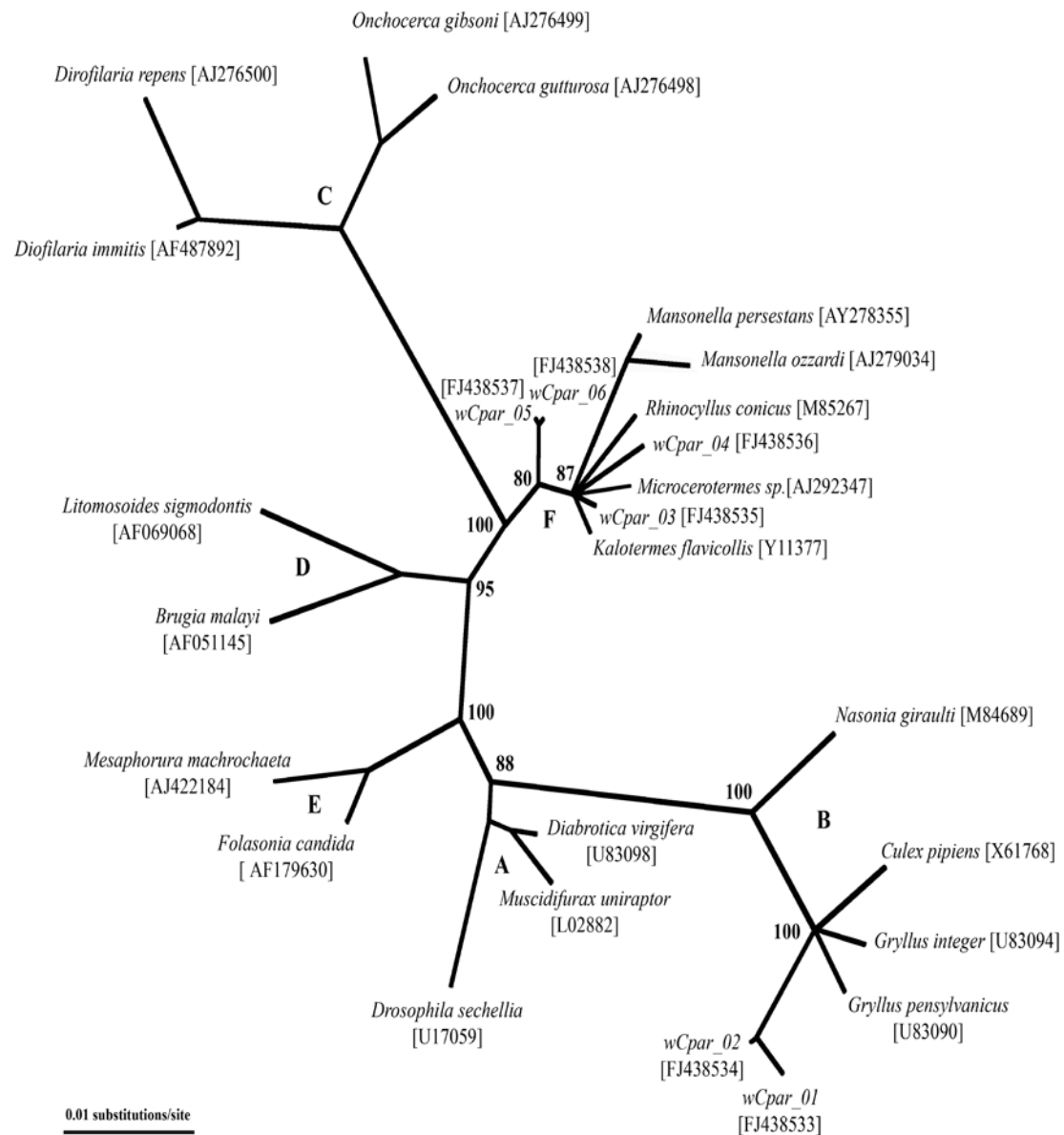


Figura 5.1.1. Filogenia de las cepas detectadas de *Wolbachia*. Se muestra el árbol filogenético no enraizado basado en el alineamiento (1208 pb) de las secuencias del gen *16S rRNA* de *Wolbachia*, usando métodos de inferencia bayesiana. Los supergrupos vienen indicados por las letras A-F. Los números al lado de los nodos corresponden a las probabilidades posteriores bayesianas. Los nombres de los taxones indican la especie hospedadora y están acompañados por los números de acceso a las secuencias del gen *16S rRNA*. *wCpar*, cepas de *C. parallelus* detectadas en este estudio.

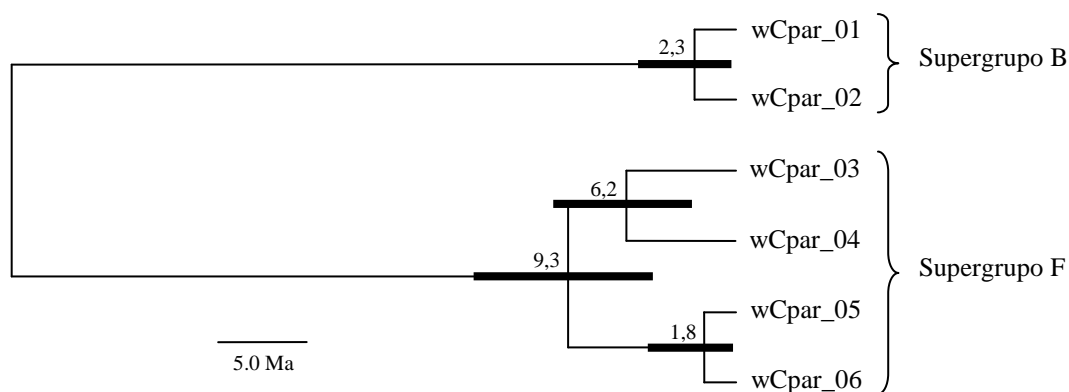


Figura 5.1.2. Coevolución de *Wolbachia* y *C. parallelus*. Se muestra el árbol filogenético de las cepas de la bacteria con los tiempos de divergencia calculados a partir de las secuencias obtenidas del gen *16S rRNA*. Las barras gruesas representan el intervalo de credibilidad al 95%.

Se han calculado los tiempos necesarios para generar la diversidad observada, partiendo del supuesto de que las distintas cepas encontradas en *C. parallelus* pertenecientes a un mismo supergrupo hubieran divergido dentro de este sistema (Figura 5.1.2). Se ha asumido una tasa de mutación del 2% por sitio cada 50 Ma. El ancestro común más reciente (MRCA, de sus siglas en inglés) de las cepas del supergrupo B habría existido hace unos 2,3 Ma con un intervalo de credibilidad al 95% entre 0,3 y 5,6 Ma. Por su parte, el MRCA de las cepas del supergrupo F se remontaría hasta hace 9,3 Ma con un intervalo de credibilidad entre 4,9 y 14,8 Ma. Dentro del supergrupo F, las cepas *wCpar_03* y *wCpar_04* compartirían un ancestro común hace 6,2 Ma con un intervalo de credibilidad entre 2,7 y 10,9 Ma. La divergencia entre las cepas *wCpar_05* y *wCpar_06* habría ocurrido más recientemente, situándose su MCRA hace 1,8 Ma con un intervalo de credibilidad entre 0,1 y 4,9 Ma.

5.2 La infección de *Wolbachia* en las poblaciones estudiadas.

Todas las poblaciones incluidas en este estudio han mostrado infección por *Wolbachia*, aunque revelan diferencias con respecto al tipo de infección y a su incidencia. Las poblaciones situadas más al norte de Europa muestran una baja incidencia de infección, mientras que la mayoría de los individuos de las poblaciones ibéricas portan algún tipo bacteriano. A través de la zona híbrida se establece un gradiente de norte a sur desde niveles bajos de infección hasta niveles muy altos (Figura 5.2.1).

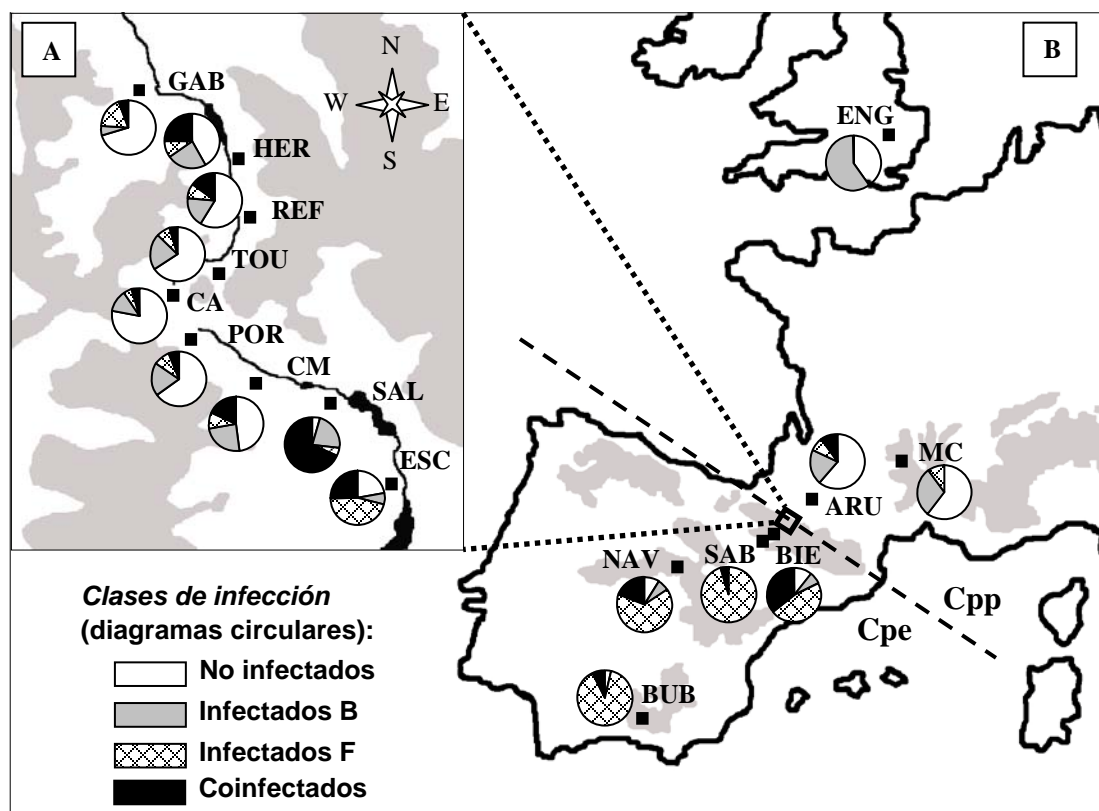


Figura 5.2.1. Mapa de la infección mostrada por las poblaciones muestreadas. A, poblaciones del transecto de la zona híbrida: Gabas (GAB), L'Herminie (HER), Refugio (REF), Tourmont (TOU), Cabane de L'Araille (CA), Portalet (POR), Corral de Mulas (CM), Sallent de Gállego (SAL) y Escarrilla (ESC). B, poblaciones puras localizadas fuera de la zona híbrida: Inglaterra (ENG), Massif Centrale (MC), Arudy (ARU), Biescas (BIE), Sabiñánigo (SAB), Navafría (NAV), Bubiión (BUB).

Los tipos y las frecuencias de infección en las poblaciones localizadas fuera de la zona híbrida se muestran en la Tabla 5.2.1. Se puede observar que, en todas las poblaciones está presente alguna cepa de *Wolbachia*, pudiéndose encontrar proporciones variables de individuos coinfectados por tipos bacterianos pertenecientes a ambos supergrupos. Así pues, los individuos pueden clasificarse en una de las siguientes cuatro categorías de infección: no infectados, infectados B, infectados F y coinfectados. La infección por *Wolbachia* está ampliamente extendida en las poblaciones Cpe, donde los porcentajes de infección se encuentran comprendidos entre el 76% y el 100% de los individuos. Sin embargo, en las poblaciones Cpp se observan porcentajes por debajo del 43% de los individuos, excepto en el caso de Inglaterra, donde el 60% de los individuos presenta infección por el supergrupo B. En la infección de las poblaciones ibéricas, los individuos infectados con cepas del supergrupo F son

Tabla 5.2.1. Frecuencias de infección las poblaciones fuera de la zona híbrida.

Población	Año	Frecuencias de los tipos de infección				N
		No infectados	Infectados B	Infectados F	Coinfectados	
Inglaterra (RU/Cpp)	2002	0.400	0.600	0.000	0.000	15
M. Central (Fr/Cpp)	2002	0.600	0.300	0.100	0.000	10
Arudy (PFr/Cpp)	2003	0.576	0.192	0.162	0.071	99
	2005	0.667	0.137	0.029	0.167	102
	2006	0.590	0.300	0.050	0.060	100
	Total	0.611	0.209	0.080	0.100	301
Biescas (PEs/Cpe)	2004	0.212	0.115	0.442	0.231	52
	2005	0.000	0.023	0.659	0.318	44
	2006	0.102	0.068	0.322	0.508	59
	Total	0.110	0.071	0.458	0.361	155
Sabiñánigo (PEs/Cpe)	2004	0.000	0.000	1.000	0.000	22
	2006	0.000	0.000	0.935	0.065	46
	Total	0.000	0.000	0.956	0.044	68
Navafría (SC/Cpe)	2002	0.125	0.029	0.673	0.173	104
	2003	0.235	0.037	0.642	0.086	81
	2005	0.035	0.098	0.635	0.232	285
	Total	0.089	0.072	0.645	0.194	470
Bubión (SN/Cpe)	2004	0.038	0.000	0.887	0.075	53

RU, Reino Unido; Fr, Francia; PFr, Pirineos francés; PEs, Pirineos español; SC, Sistema Central; SN, Sierra Nevada.

del orden de 1,5 a 15 veces más abundantes que los individuos infectados con cepas del supergrupo B. Esta relación se invierte cualitativamente en el caso de las poblaciones Cpp donde los individuos infectados por el supergrupo B son tanto o más abundantes que los individuos infectados por el supergrupo F, llegando a triplicarse en algunas poblaciones el número de individuos portadores de cepas B frente a aquellos con cepas F.

Las frecuencias de infección observadas en las muestras estudiadas (Anexo I) no permiten considerar la infección por el supergrupo B y la infección por el supergrupo F como eventos independientes ($G = 240,74$, g.l. = 1, $P < 0,001$, para el conjunto total de datos). En general, se observa un patrón en el que existe una mayor proporción de individuos coinfectados de la que se esperaría considerando independencia. Sin embargo, este patrón no se mantiene en todas las poblaciones, ni tampoco temporalmente dentro de una población.

Tabla 5.2.2. Frecuencias de infección en las poblaciones dentro de la zona híbrida.

Población	Año	Frecuencias de los tipos de infección				N
		No infectados	Infectados B	Infectados F	Coinfectados	
Gabas (PFr/Cpp)	2002	0.688	0.075	0.215	0.022	93
	2003	0.633	0.083	0.239	0.046	109
	2005	0.721	0.027	0.135	0.117	111
	2006	0.780	0.044	0.165	0.011	91
	Total	0.703	0.057	0.188	0.052	404
L'Hermine (PFr/H)	2005	0.474	0.116	0.042	0.368	95
	2006	0.359	0.359	0.152	0.130	92
	Total	0.417	0.235	0.096	0.251	187
Refugio (PFr/H)	2005	0.598	0.112	0.047	0.243	107
	2006	0.575	0.245	0.123	0.057	106
	Total	0.587	0.178	0.085	0.150	213
Tourmont (PFr/H)	2003	0.656	0.180	0.117	0.047	128
	2005	0.710	0.160	0.070	0.060	100
	2006	0.604	0.323	0.052	0.021	96
	Total	0.657	0.216	0.083	0.043	324
C. L'Araïlle (PFr/H)	2003	0.700	0.142	0.133	0.025	120
	2005	0.861	0.056	0.000	0.083	108
	2006	0.772	0.193	0.009	0.026	114
	Total	0.775	0.132	0.050	0.044	342
Portalet (PEs/H)	2002	0.525	0.297	0.069	0.109	101
	2003	0.611	0.160	0.191	0.038	131
	2004	0.685	0.162	0.099	0.054	111
	2005	0.667	0.117	0.105	0.111	162
	2006	0.697	0.247	0.045	0.010	198
	Total	0.647	0.195	0.098	0.060	703
C. Mulas (PEs/H)	2003	0.488	0.381	0.083	0.048	168
	2005	0.442	0.088	0.088	0.381	113
	2006	0.495	0.198	0.119	0.188	101
	Total	0.476	0.246	0.094	0.183	382
Sallent de Gállego (PEs/H)	2002	0.047	0.221	0.128	0.605	86
	2003	0.018	0.255	0.018	0.709	110
	2004	0.068	0.316	0.068	0.549	133
	2005	0.026	0.175	0.044	0.754	114
	2006	0.052	0.186	0.015	0.747	194
	Total	0.044	0.228	0.047	0.681	637
Escarrilla (PEs/Cpe)	2002	0.223	0.071	0.545	0.161	112
	2003	0.173	0.058	0.471	0.298	104
	2005	0.159	0.065	0.364	0.411	107
	2006	0.366	0.054	0.419	0.161	93
	Total	0.226	0.063	0.452	0.260	416

PFr, Pirineos francés; PEs, Pirineos español; H, híbridos; Cpp y Cpe, poblaciones puras

No se han encontrado diferencias entre sexos en la incidencia de la infección en ninguna de las muestras que se han podido analizar (Anexo I) excepto en Portalet (2002) y Sallent de Gállego (2006) ($G = 16,08$, g.l. = 2, $P < 0,001$; $G = 15,52$, g.l. = 2, $P < 0,001$, respectivamente). En ambos casos, las diferencias consisten en una incidencia de infección por el supergrupo B menor de la esperada en los machos que, a su vez, presentan un exceso de individuos no infectados en comparación con las hembras.

Con el fin de detectar posibles variaciones anuales en las frecuencias de infección, algunas poblaciones representativas de dentro y fuera de la zona híbrida se han monitorizado durante el periodo 2002-2006 (Tabla 5.2.1 y 5.2.2). Con la excepción de la población de Sabiñánigo, que presenta casi un 100% de individuos infectados por F de forma estable a lo largo de los años, todas las poblaciones presentan diferencias significativas en las frecuencias de infección entre los años analizados. Sin embargo, estas diferencias consisten en aumentos y disminuciones oscilantes, no pudiéndose determinar una tendencia clara durante dicho periodo (Figura 5.2.2). Por ejemplo, a pesar de la variación interanual encontrada, no existen diferencias significativas entre el primer y último año en las poblaciones situadas en los extremos de la zona híbrida (Gabas: $G = 2,23$, g.l. = 3, $P = 0,527$; Escarrilla: $G = 5,47$, g.l. = 3, $P = 0,141$). Por el contrario, sí hay diferencias significativas en poblaciones localizadas en puntos intermedios del transecto (Portalet: $G = 18,87$, g.l. = 3, $P < 0,001$; Sallent de Gállego: $G = 15,80$, g.l. = 3, $P < 0,001$). Al analizar los residuos tipificados corregidos de las tablas de contingencia, se observa que en Portalet la proporción de individuos no infectados aumenta en 17,2 puntos porcentuales entre el primer año y el cuarto. Por su parte, la frecuencia de individuos coinfectados disminuye en 9,9 puntos durante el mismo periodo. En el caso de Sallent de Gállego, la frecuencia de individuos coinfectados se incrementa en 14,2 puntos porcentuales, mientras que los individuos infectados por F disminuyen en 11,3 puntos.

5.3 Patrones de infección en *C. parallelus*.

Al existir diferencias significativas en las frecuencias de infección tanto entre poblaciones como dentro de poblaciones a lo largo del tiempo, con el total de las 45 muestras disponibles se ha llevado a cabo un análisis “ciego”, ignorando el origen o la

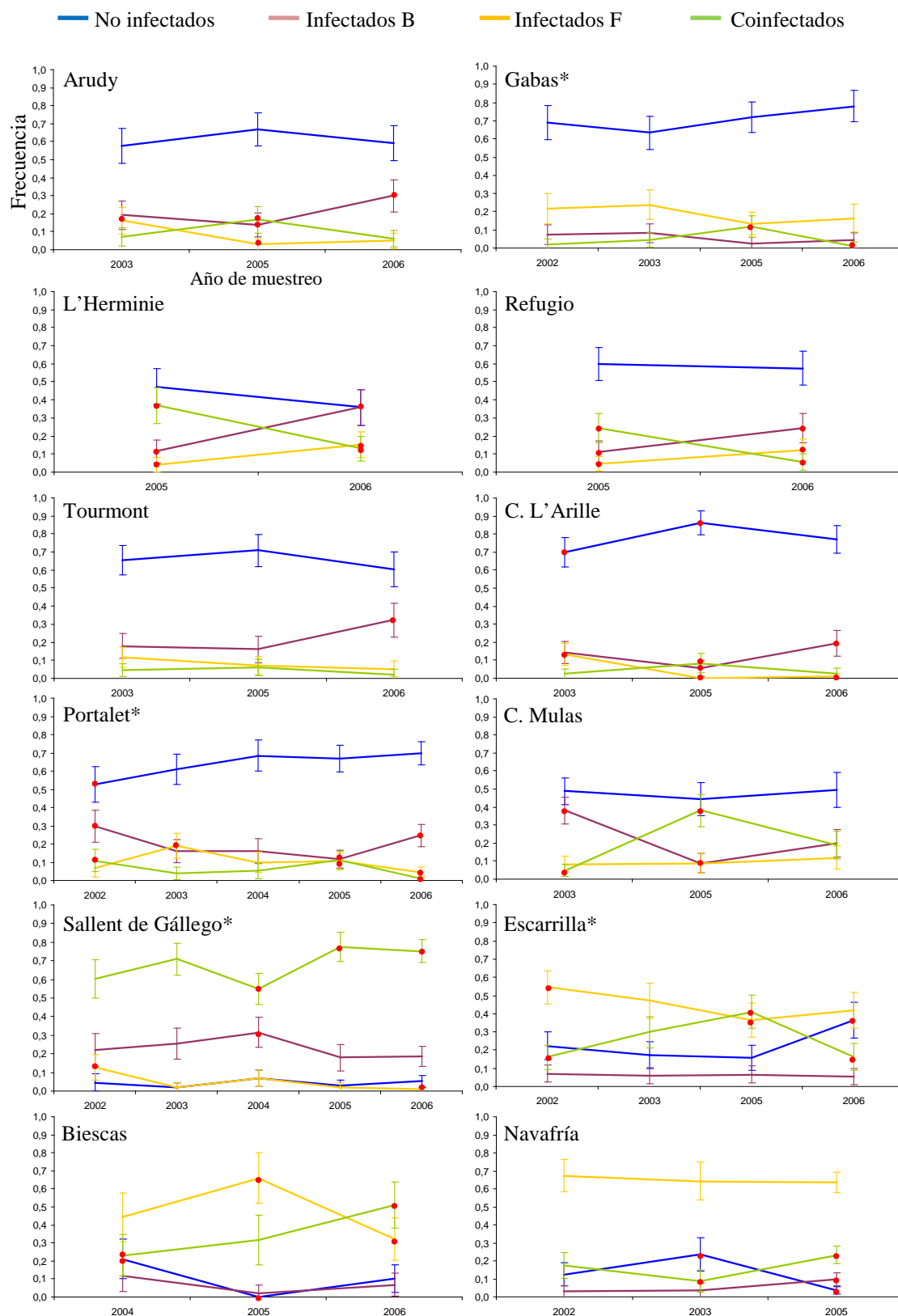


Figura 5.2.2. Variación temporal de la infección. Frecuencias de infección de algunas de las poblaciones muestreadas en distintos años. (*), poblaciones muestreadas más intensamente. Los puntos rojos denotan aquellas categorías de infección que contribuyen significativamente a las diferencias observadas entre los distintos años según los residuos tipificados corregidos de las tablas de contingencia.

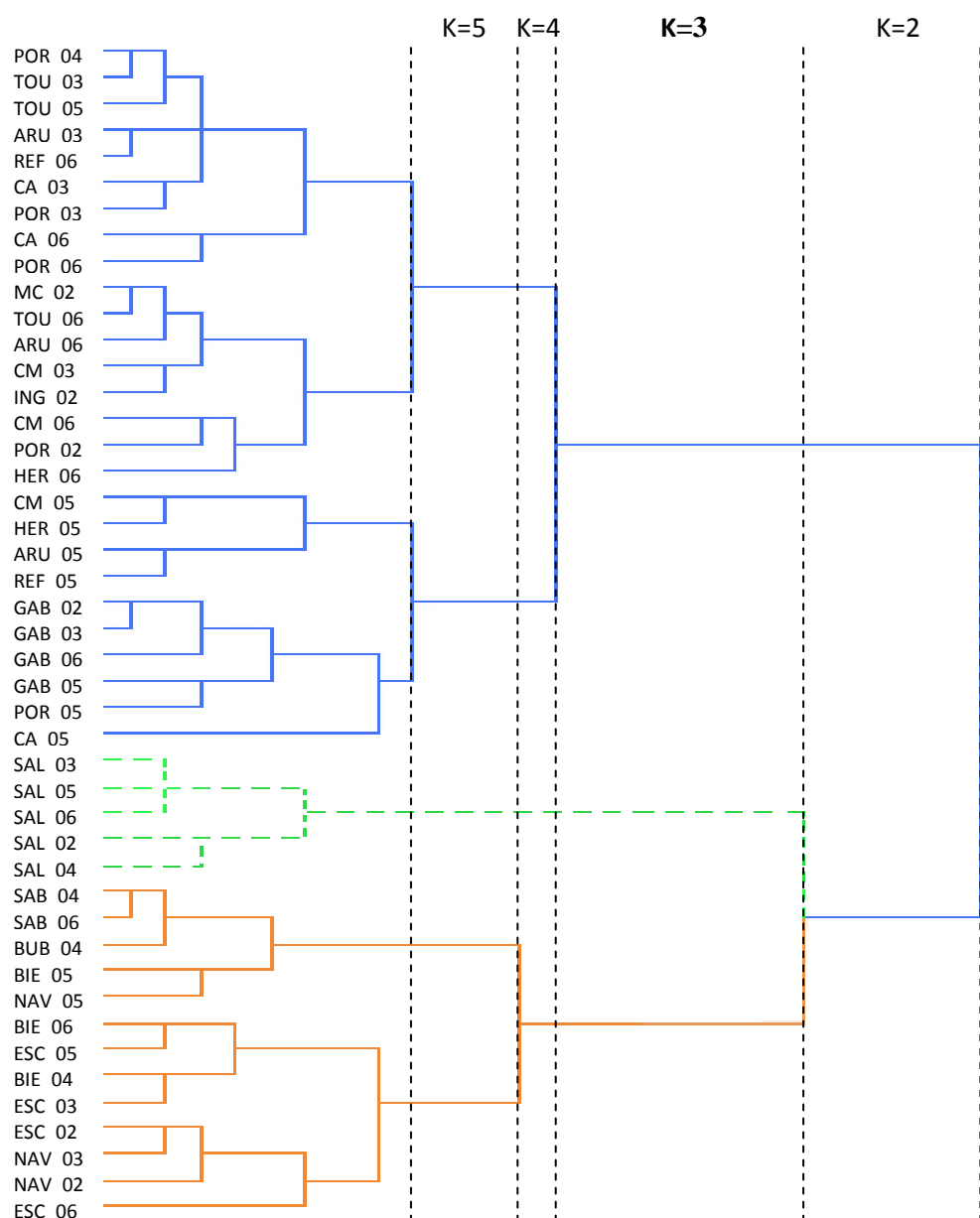


Figura 5.3.1. Dendrograma de las muestras analizadas, obtenido mediante HCA (ver texto). Los colores denotan los grupos elegidos como los más apropiados para agrupar las muestras ($K = 3$). K, número de grupos. El código de las muestras representa la abreviatura de la población (igual que en Figura 5.2.1) y el año de muestreo.

fecha de recogida de las mismas. El objetivo perseguido con este análisis fue clasificar las muestras de forma independiente, atendiendo sólo a las frecuencias de las categorías de infección que presentarán. Dicha clasificación se realizó mediante un análisis jerárquico de conglomerados (HCA, de sus siglas en inglés *Hierarchical Cluster Analysis*), generándose una matriz de distancia basada en la medida χ^2 entre todos los pares posibles de muestras. A partir de dicha matriz, se generó un dendrograma (Figura 5.3.1).

El análisis mediante HCA contempla la clasificación de las muestras en un número (K) de grupos que va desde $K = 2$ a $K = 5$ (Figura 5.3.1). Para definir el número correcto de grupos, debemos de elegir aquél que maximice la diferencia entre los grupos, y minimice la diferencia entre las muestras dentro de los grupos. Hay que tener en cuenta que llegar a una agrupación en la que no haya diferencias significativas entre las muestras dentro de los grupos es bastante improbable ya que, como se ha comentado anteriormente, se han encontrado diferencias entre las muestras de una misma población recolectadas en años distintos.

El dendrograma obtenido sugiere la agrupación de las muestras en tres grupos ($K = 3$), ya que la longitud del intervalo correspondiente a este valor es sensiblemente mayor que la observada para el resto (Figura 5.3.1). La exploración visual de la gráfica donde se representa la distribución de las muestras, en el espacio tridimensional definido por las frecuencias de infección, apoya esta decisión (Figura 5.3.2).

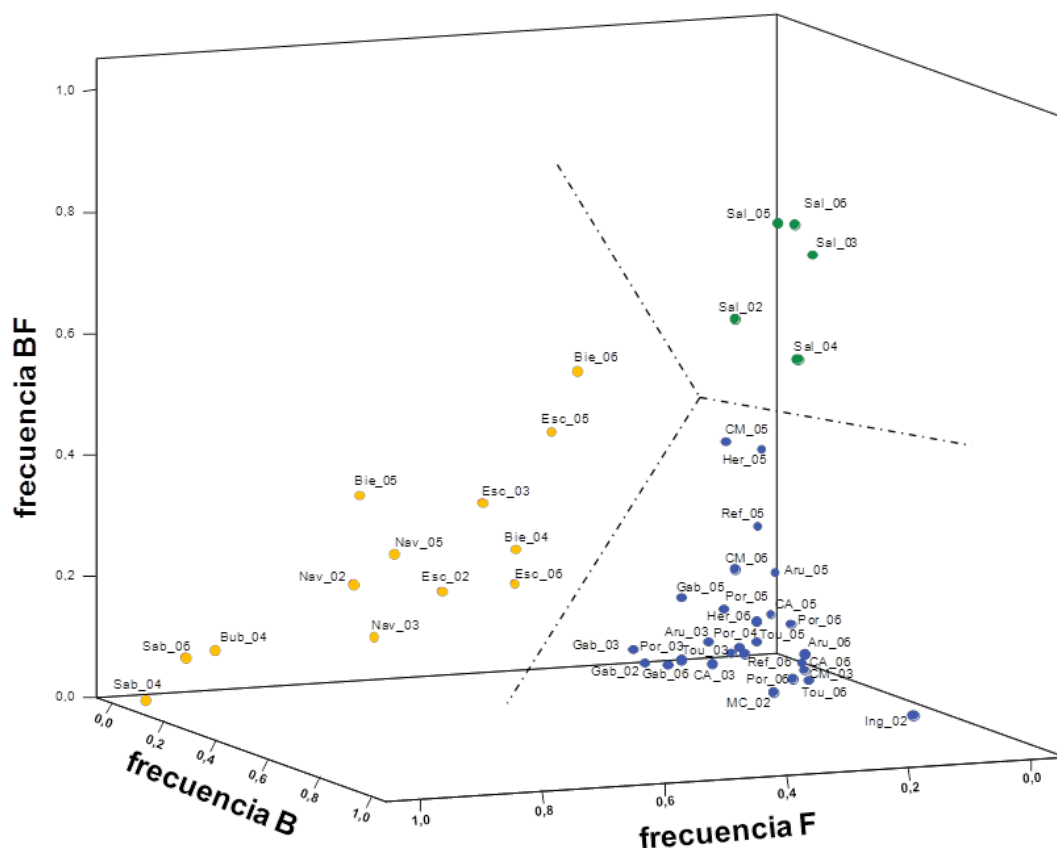


Figura 5.3.2. Representación gráfica de las muestras según frecuencias de infección. Los colores son los mismos que los usados en la Figura 5.3.1 para diferenciar los grupos generados con $K = 3$. Los códigos de las muestras también son los mismos.

Al realizar la descomposición de la entropía total (G_{total}) mediante las propiedades del test G (Tabla 5.3.1), las diferencias entre los grupos de muestras (G_a , muestras agrupadas) cuando $K = 3$, explican el 74,7% de la entropía total. Esto supone un incremento sustancial respecto del valor obtenido con $K = 2$ ya que, en este caso, la diferencia entre grupos representa el 52,8% de la entropía total. Sin embargo, el incremento de este porcentaje es mucho menor cuando determinamos el número de grupos en $K = 4$ y $K = 5$ (79,9% y 82,7% de la entropía total, respectivamente), lo que pone en duda la conveniencia de aumentar el número de grupos más allá de $K = 3$ (Figura 5.3.3).

El AMOVA muestra que, con un $K = 3$, la diferenciación entre grupos se maximiza al tiempo que se minimiza la diferenciación entre poblaciones dentro de grupos (Tabla 5.3.2). La varianza explicada por las diferencias entre grupos (σ_a^2) supone el 33,2% de la varianza total (σ_{total}^2), mientras que la varianza atribuible a las diferencias entre poblaciones dentro de grupos (σ_b^2) representa el 4,1%. El estadístico $\Phi_{SC} = 0,062$, aunque relativamente bajo, muestra que aún hay diferencias significativas entre las poblaciones dentro de los grupos ($P < 0,001$).

Tabla 5.3.1. Descomposición de la entropía total según el valor de K.

Diferencias	K = 2					K = 3				
	G	g.l.	P-valor	%	G_{total}	G	g.l.	P-valor	%	G_{total}
Entre grupos	G_a	1782,55	3	< 0,001	52,8	G_a	2520,9	6	< 0,001	74,7
Entre muestras dentro de grupos	G_h	1594,21	129	< 0,001	47,2	G_h	855,86	126	< 0,001	25,3
	G_{h1}	564,63	78	< 0,001		G_{h1}	564,63	78	< 0,001	
	G_{h2}	1029,58	51	< 0,001		G_{h2}	36,23	12	< 0,001	
						G_{h3}	255,00	36	< 0,001	
Entre muestras	G_{total}	3376,76	132	< 0,001	100	G_{total}	3376,76	132	< 0,001	100
Diferencias	K = 4					K = 5				
	G	g.l.	P-valor	%	G_{total}	G	g.l.	P-valor	%	G_{total}
Entre grupos	G_a	2688,06	9	< 0,001	79,6	G_a	2792,77	12	< 0,001	82,7
Entre muestras dentro de grupos	G_h	688,7	123	< 0,001	20,4	G_h	583,99	120	< 0,001	17,3
	G_{h1}	184,42	48	< 0,001		G_{h1}	184,42	48	< 0,001	
	G_{h2}	213,05	27	< 0,001		G_{h2}	213,05	27	< 0,001	
	G_{h3}	36,23	12	< 0,001		G_{h3}	36,23	12	< 0,001	
	G_{h4}	255,00	36	< 0,001		G_{h4}	62,06	12	< 0,001	
						G_{h5}	88,23	21	< 0,001	
Entre muestras	G_{total}	3376,76	132	< 0,001	100	G_{total}	3376,76	132	< 0,001	100

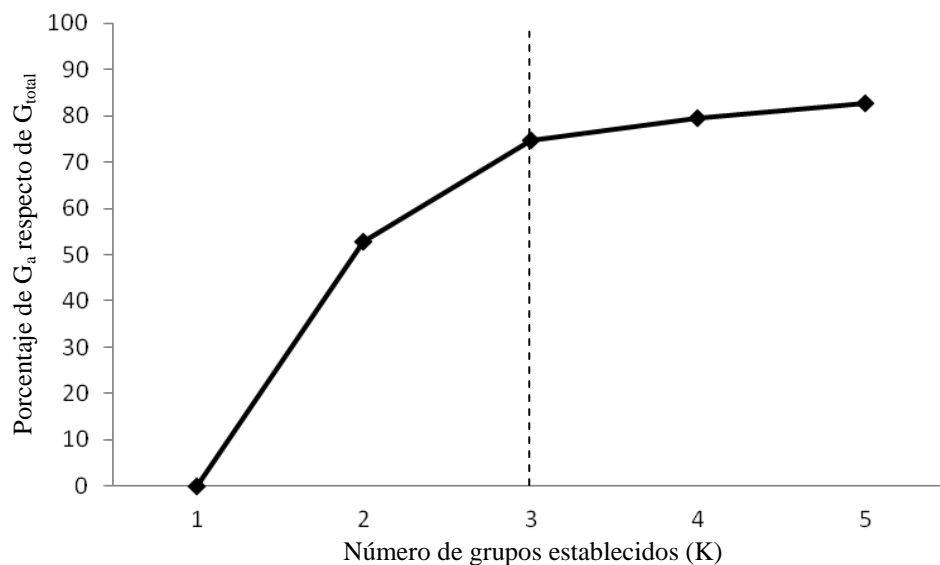


Figura 5.3.3. Contribución de las diferencias entre grupos (G_a) a la entropía total (G_{total}). Se muestra como porcentaje en función del número de grupos establecido (K).

Si bien es cierto que tanto la descomposición del test G (Tabla 5.3.1) como el AMOVA (Tabla 5.3.2), muestran que las poblaciones dentro de los grupos no son homogéneas con un $K = 3$, tampoco lo son cuando K asume los otros valores posibles. Por otra parte, cuando se analiza la procedencia de las muestras y el año de captura, el hecho de establecer un número de grupos superior a $K = 3$ supone separar muestras de distintos años recogidas en una misma población (Figura 5.3.1).

Por todo lo expuesto anteriormente, se han definido finalmente tres patrones de infección (Figura 5.3.4). El “patrón del norte” incluye las poblaciones situadas al norte de los Pirineos y, dentro de la zona híbrida, las poblaciones del norte del transecto estudiado, situadas desde Gabas, en Francia, a Corral de Mulas, en España. El “patrón del sur” engloba las poblaciones al sur de los Pirineos y la población de Escarrilla, localizada en el extremo meridional del transecto. El tercer patrón incluye exclusivamente las muestras procedentes de Sallent de Gállego, recibiendo el nombre de dicha población.

Tabla 5.3.2. Análisis de la varianza molecular (AMOVA). Cada clase de infección se ha considerado como un haplotipo diferente del que desconocemos la relación que guarda con el resto. K, número de grupos en los que son divididas las muestras.

Fuente de variación	K = 2						K = 3					
	g.l.	SSD	Varianza	% σ^2_{total}	Φ	P-valor	g.l.	SSD	Varianza	% σ^2_{total}	Φ	P-valor
Entre grupos (σ^2_a)	1	247,97	0,1094	26,5	$\Phi_{CT} = 0,265$	< 0,001	2	356,50	0,1388	33,2	$\Phi_{CT} = 0,332$	< 0,001
Entre muestras dentro de grupos (σ^2_b)	43	193,28	0,0411	10,0	$\Phi_{SC} = 0,136$	< 0,001	42	84,75	0,0172	4,1	$\Phi_{SC} = 0,062$	< 0,001
Dentro de muestras (σ^2_c)	4635	1216,05	0,2624	63,5	$\Phi_{ST} = 0,365$	< 0,001	4635	1216,05	0,2624	62,7	$\Phi_{ST} = 0,373$	< 0,001
Total (σ^2_{total})	4679	1657,30	0,4129				4679	1657,30	0,4184			

Fuente de variación	K = 4						K = 5					
	g.l.	SSD	Varianza	% σ^2_{total}	Φ	P-valor	g.l.	SSD	Varianza	% σ^2_{total}	Φ	P-valor
Entre grupos (σ^2_a)	3	368,51	0,1076	27,9	$\Phi_{CT} = 0,279$	< 0,001	4	379,82	0,1062	27,9	$\Phi_{CT} = 0,279$	< 0,001
Entre muestras dentro de grupos (σ^2_b)	41	72,74	0,0149	3,9	$\Phi_{SC} = 0,054$	< 0,001	40	61,43	0,0127	3,3	$\Phi_{SC} = 0,046$	< 0,001
Dentro de muestras (σ^2_c)	4635	1216,05	0,2624	68,2	$\Phi_{ST} = 0,318$	< 0,001	4635	1216,05	0,2624	68,8	$\Phi_{ST} = 0,312$	< 0,001
Total (σ^2_{total})	4679	1657,30	0,3849				4679	1657,30	0,3813			

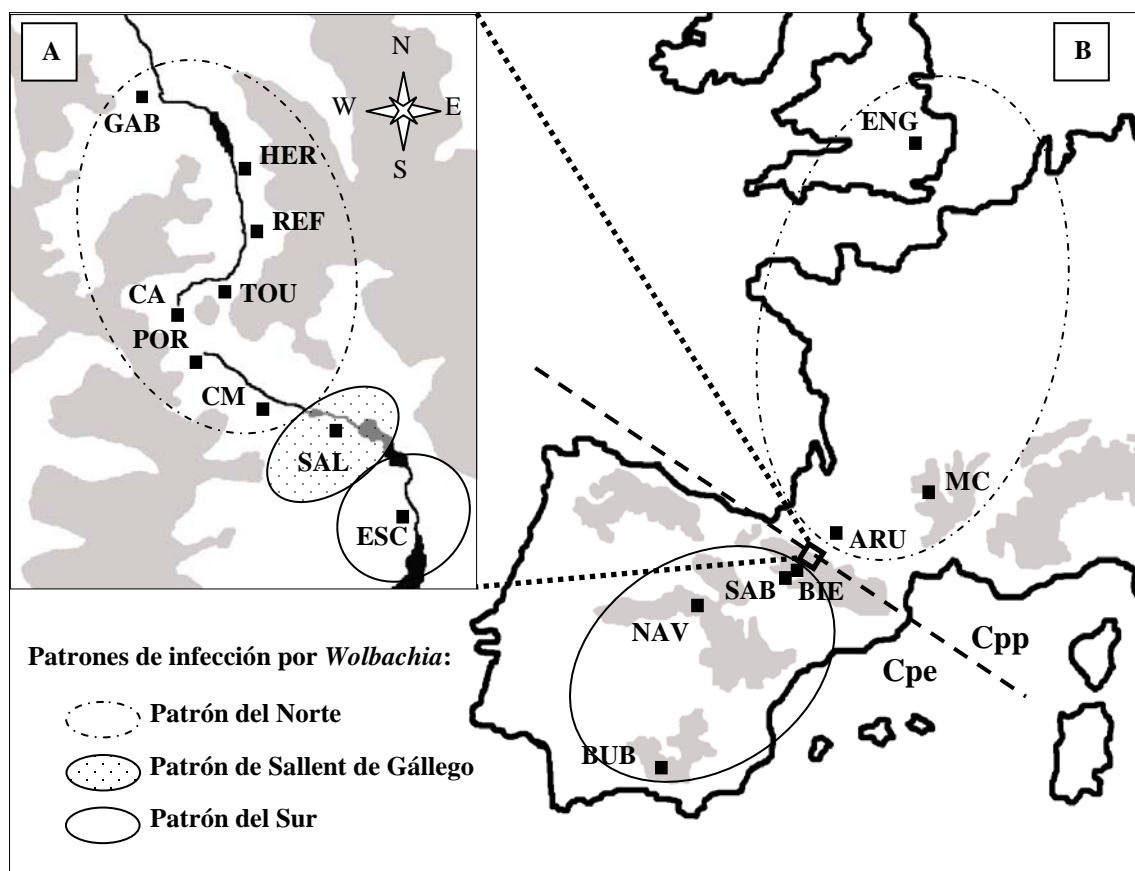


Figura 5.3.4. Mapa de los partones de infección. A, poblaciones del transecto de la zona híbrida: Gabas (GAB), L’Herminie (HER), Refugio (REF), Tourmont (TOU), Cabane de L’Araille (CA), Portalet (POR), Corral de Mulas (CM), Sallent de Gállego (SAL) y Escarrilla (ESC). B, poblaciones puras localizadas fuera de la zona híbrida: Inglaterra (ENG), Massif Centrale (MC), Arudy (ARU), Biescas (BIE), Sabiñánigo (SAB), Navafría (NAV), Bubiión (BUB).

La distribución de las proporciones de infección de los tres patrones identificados se muestra en la Figura 5.3.5. En las poblaciones incluidas en el patrón del norte predominan los individuos no infectados, siendo éste el rasgo más característico de dicho patrón de infección. Por el contrario, el patrón del sur se caracteriza por el predominio de individuos infectados por el supergrupo F, mientras que el patrón del Sallent de Gállego lo hace por mostrar una coinfección muy extendida.

El análisis no paramétrico de la varianza muestra diferencias significativas al comparar las proporciones de los tres patrones para todas las clases de infección (prueba de Kruskal-Wallis: no infectados, $H = 31,668$, g.l. = 2, $P < 0,001$; infectados B, $H = 21,104$, g.l. = 2, $P < 0,001$; infectados F, $H = 28,328$, g.l. = 2, $P < 0,001$; coinfectados,

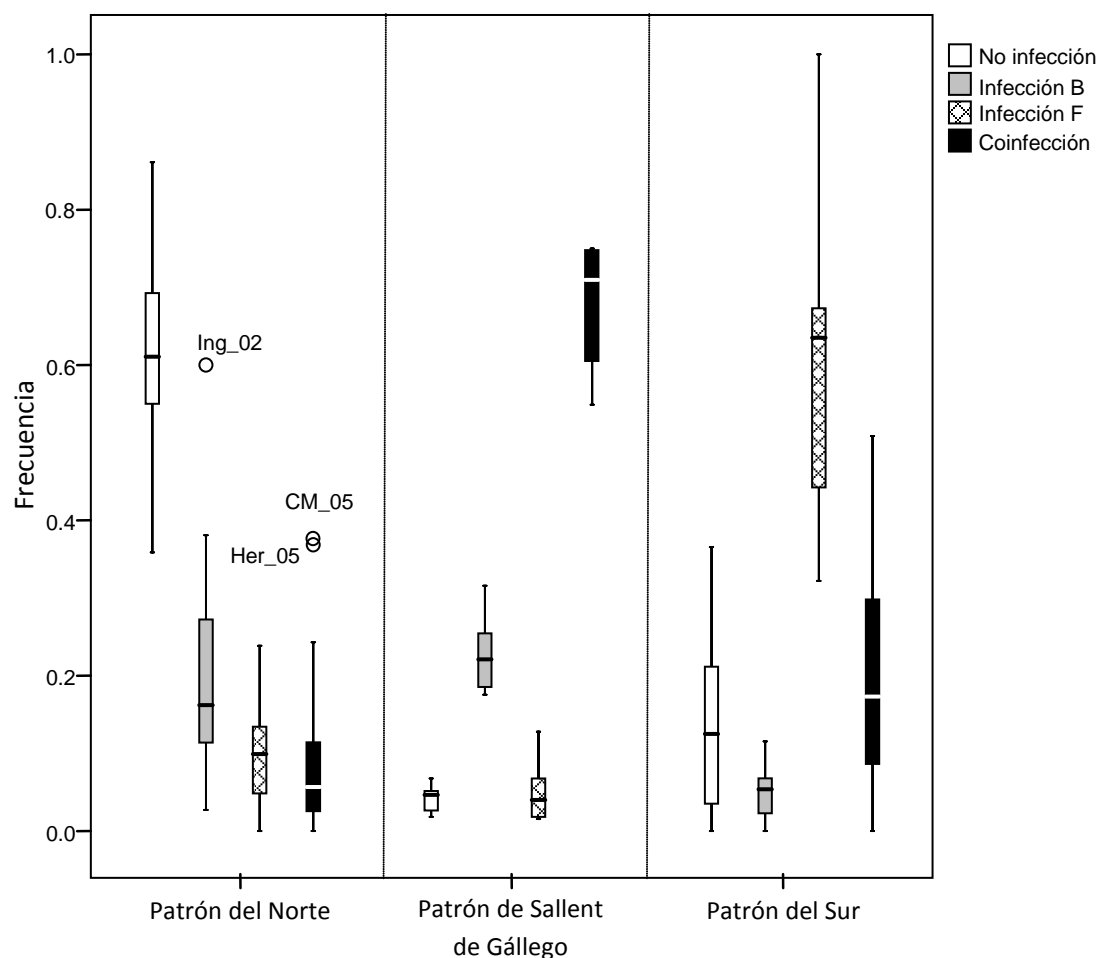


Figura 5.3.5. Diagrama de cajas de los patrones de infección. Se representan las proporciones de cada clase de infección. Los rectángulos indican el 50% de los valores, entre el primer y tercer cuartil. Las líneas dentro de los rectángulos indican las medianas. Los bigotes muestran el menor y mayor valor, excluyendo los valores atípicos. Estos últimos se indican mediante los círculos con el código de la muestra a la que pertenecen (abreviatura igual que en Figura 5.3.3 y el año de muestreo).

Tabla 5.3.3. Comparación de las clases de infección entre los patrones por pares.

Prueba U de Mann-Whitney	O	B	F	BF
Patrón del Norte vs Patrón del Sur	U = 1 **	U = 29 **	U = 0 **	U = 80 *
Patrón del Norte vs Patrón de Sallent de Gállego	U = 0 **	U = 45 n.s.	U = 38 n.s.	U = 0 **
Patrón de Sallent de Gállego vs Patrón del Sur	U = 21 n.s.	U = 0 **	U = 0 **	U = 0 **

(*), $P < 0.05$; (**), $P < 0.001$; n.s, no significativo.

$H = 19,075$, g.l. = 2, $P < 0,001$). La comparación de los patrones de infección por pares (Tabla 5.3.3) muestra diferencias significativas entre el patrón del norte y el patrón del sur para todas las clases de infección. Por el contrario, no se observaron diferencias significativas entre el patrón del norte y el patrón de Sallent de Gállego en las proporciones de individuos infectados por el supergrupo B, ni de individuos infectados por el supergrupo F. Por último, el rango de proporciones de individuos no infectados es similar en el patrón del sur y el patrón de Sallent de Gállego siendo, en ambos casos, proporciones más bajas en comparación al patrón del Norte.

5.4 Distribución de la infección en un transecto de la zona híbrida.

Existe un cambio en las frecuencias de infección a lo largo del transecto; desde las frecuencias típicas del patrón de infección del norte (desde Gabas hasta Corral de Mulas) hasta las del patrón del sur (Escarrilla). El patrón de Sallent de Gállego, situado en la localidad del mismo nombre, sirve de nexo entre ambos patrones (Figura 5.4.1). Los individuos no infectados constituyen la categoría predominante desde Gabas hasta Corral de Mulas (Figura 5.4.1a). La proporción de individuos no infectados disminuye drásticamente desde Corral de Mulas hasta Sallent de Gállego, donde tan sólo un 4% de la población está libre de la infección, remontando hasta el 23% en la población de Escarrilla. La incidencia de la infección por el supergrupo B (Figura 5.4.1b) es del 6% en la población de Gabas, sube al 20% en la población de L'Herminie, y a partir de aquí se mantiene más o menos constante hasta Sallent de Gállego, para caer de nuevo al 6% en Escarrilla. La incidencia de la infección por el supergrupo F (Figura 5.4.1c) es muy similar desde Gabas hasta Sallent de Gállego, alrededor del 10%, aumentando hasta el 45% en Escarrilla. La coinfección (Figura 5.4.1d) es la categoría más frecuente en la población de Sallent de Gállego, afectando al 68% de los individuos, para caer al 12% cuando nos movemos hacia las poblaciones del norte y al 26% cuando lo hacemos en dirección sur.

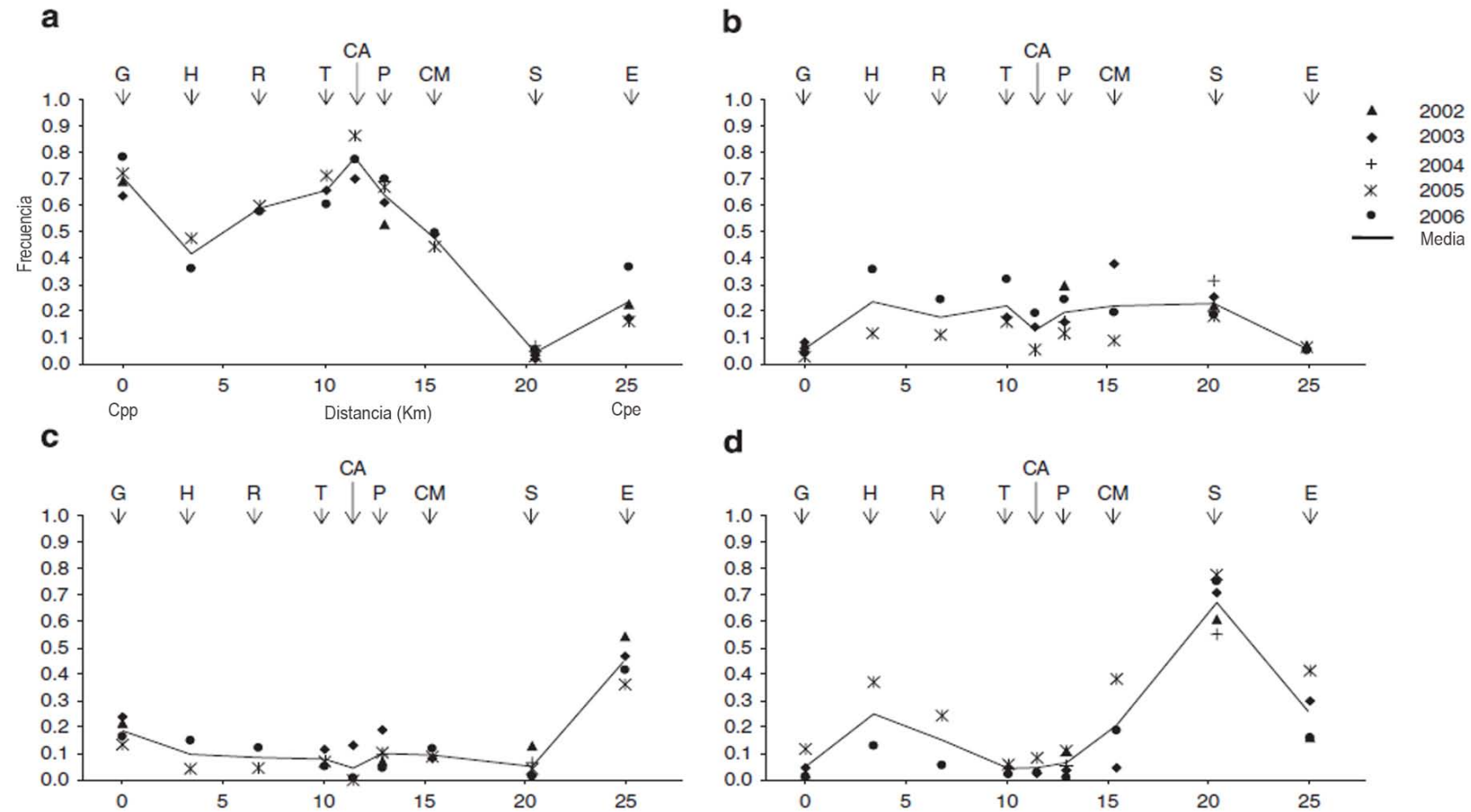


Figura 5.4.1. Variación de la infección a lo largo del transecto. Se muestra la variación de cada clase de infección: a, no infectados; b, infectados B; c, infectados F; d, coinfectados. Las flechas indican la posición de las poblaciones estudiadas: G, Gabas; H, L'Herminie; R, Refugio; T, Tourmont; CA, Cabane de L'Araille; P, Portalet; C, Corral de Mulas; S, Sallent de Gállego; E, Escarrilla.

EFFECTOS DE *WOLBACHIA* EN *C. PARALLELUS*

6.1 Caracterización de los cruzamientos establecidos.

A partir de los 110 cruzamientos establecidos entre individuos híbridos capturados en Portalet se obtuvieron un total de 623 puestas y 4792 huevos. Tras analizar la infección de los individuos parentales, 86 cruzamientos pueden clasificarse como compatibles (no susceptibles de presentar IC inducida por *Wolbachia*), 16 cruzamientos son susceptibles de presentar incompatibilidad unidireccional y 8 lo son de mostrar incompatibilidad bidireccional (Tabla 6.1.1). En el caso de los 31 cruzamientos informativos establecidos entre individuos procedentes de poblaciones consideradas puras, se obtuvo un total de 149 puestas y 1361 huevos. Tras el análisis de la infección en los individuos parentales, 23 cruzamientos pueden clasificarse como compatibles, 4 son susceptibles de presentar IC unidireccional y otros 4 cruzamientos son susceptibles de sufrir IC bidireccional (Tabla 6.1.2).

Comparando los valores obtenidos en los cruzamientos entre individuos híbridos con los obtenidos en los cruzamientos entre individuos puros, se pueden observar diferencias significativas en el número de puestas obtenidas por cruzamiento (U de Mann-Whitney = 1084, $n_1 = 110$, $n_2 = 31$, $P = 0,001$). Mientras que los cruzamientos híbridos producen de media 5,66 puestas, los cruzamientos entre individuos puros producen de media 4,81 puestas. Sin embargo, no se observan diferencias significativas en el número de huevos por cruzamiento (43,56 y 43,90 huevos, respectivamente; $t_{139} = 0,141$, $P = 0,888$). Este resultado se entiende al comprobar que los tamaños de puestas observados en hembras híbridas son menores que los observados en las hembras puras (7,69 y 9,13 huevos por puesta, respectivamente; U de Mann-Whitney = 624, $n_1 = 110$, $n_2 = 31$, $P < 0,001$). Las diferencias descritas entre los cruzamientos híbridos y los puros se mantienen cuando las comparaciones se realizan dentro de cada categoría de compatibilidad (resultados no mostrados). Por otro lado, no se observan diferencias significativas entre las hembras puras Cpp y Cpe con respecto al número de puestas por cruzamiento (U de Mann-Whitney = 92, $n_1 = 15$, $n_2 = 16$, $P = 0,281$), al tamaño de las puestas (U de Mann-Whitney = 115,5, $n_1 = 15$, $n_2 = 16$, $P = 0,861$), ni tampoco con respecto al número de huevos por cruzamiento ($t_{29} = 1,152$, $P = 0,259$).

Tabla 6.1.1. Cruzamientos realizados entre individuos híbridos.

Cruzamiento		Puestas		Huevos		Embriones		Embriones / Huevos	
Tipo / Infección (♀x♂)	N	Media	DS	Media	DS	Media	DS	Media	DS
Compatible	86	5,63	1,37	44,81	12,63	34,74	14,44	0,772	0,213
OxO	27	5,56	1,42	44,89	11,58	33,41	15,34	0,746	0,277
BxO	27	5,67	1,44	43,59	13,14	33,56	14,33	0,760	0,200
FxO	9	6,00	1,00	48,44	15,05	38,44	14,34	0,786	0,061
BFxO	8	5,50	1,51	45,50	12,76	36,75	15,17	0,809	0,213
Otros	15	5,53	1,41	44,33	13,25	36,00	14,00	0,813	0,171
IC Unidireccional	16	5,63	1,02	39,38	8,96	19,31	11,36	0,521	0,300
OxB	9	5,67	0,71	43,11	7,82	21,56	12,75	0,517	0,281
OxF	6	5,50	1,52	32,50	7,04	18,00	9,27	0,589	0,332
OxBF	1	6,00	-	47,00	-	7,00	-	0,149	-
IC Bidireccional	8	6,13	2,10	38,50	10,74	25,50	14,84	0,654	0,269
TOTAL	110	5,66	1,38	43,56	12,19	31,83	15,07	0,727	0,246

Individuos procedentes de Portalet. DS, desviación estándar.

Tabla 6.1.2. Cruzamientos realizados entre individuos puros.

Cruzamientos		Puestas		Huevos		Embriones		Embriones / Huevos	
Tipo / Subespecie (♀x♂)	N	Media	DS	Media	DS	Media	DS	Media	DS
Compatible	23	4,91	1,08	44,87	10,09	36,65	12,07	0,830	0,209
Cpp x Cpp	6	5,50	0,55	49,67	5,39	44,00	7,40	0,885	0,104
Cpp x Cpe	4	5,25	0,96	46,50	6,95	38,50	4,65	0,839	0,128
Cpe x Cpp	5	4,60	1,34	45,60	12,90	34,00	20,09	0,802	0,420
Cpe x Cpe	8	4,50	1,20	40,00	11,61	31,88	9,98	0,803	0,134
IC Unidireccional	4	4,75	1,26	45,75	12,07	34,50	16,68	0,779	0,342
Cpp x Cpe	3	4,33	1,15	42,67	12,70	30,67	18,15	0,760	0,416
Cpe x Cpe	1	6,00	-	55,00	-	46,00	-	0,836	-
IC Bidireccional	4	4,25	0,96	36,50	11,09	14,50	16,58	0,369	0,355
Cpp x Cpp	1	5,00	-	44,00	-	39,00	-	0,886	-
Cpp x Cpe	1	4,00	-	36,00	-	3,00	-	0,083	-
Cpe x Cpp	1	5,00	-	45,00	-	10,00	-	0,222	-
Cpe x Cpe	1	3,00	-	21,00	-	6,00	-	0,286	-
TOTAL	31	4,81	1,08	43,90	10,49	33,52	14,77	0,764	0,284

Individuos procedentes de Gabas (Cpp) y Escarrilla (Cpe). DS, desviación estándar.

6.2 Efectos de *Wolbachia* en la reproducción de las hembras.

Dentro de los cruzamientos que no son susceptibles de sufrir IC inducida por *Wolbachia* (cruzamientos compatibles), no se observan diferencias significativas entre los grupos de hembras híbridas con distinta infección ni con respecto al número de huevos producidos, ni tampoco con respecto a la proporción de embriones ($P = 0,803$ y $P = 0,650$, respectivamente; Tabla 6.2.1). A tenor de estos resultados, no es posible afirmar que *Wolbachia* comprometa, por sí misma, los recursos de los que disponen las hembras híbridas infectadas para la producción de embriones. Como se muestra en la Tabla 6.1.1, la producción media de las hembras no infectadas es muy similar a la de las hembras infectadas por el supergrupo B (33,4 y 33,6 embriones por cruzamiento, respectivamente). En el caso de las hembras infectadas por el supergrupo F, y las hembras portadoras de ambos supergrupos (coinfectadas), la producción media de embriones es, incluso, ligeramente superior (38,4 y 36,8 embriones por cruzamiento, respectivamente).

Tabla 6.2.1. Comparaciones entre distintos tipos de hembras en cruzamientos compatibles.

Tipo de hembras	Huevos	Embriones/Huevos
Hembras Híbridas (OxO, BxO, FxO, BFxO)	$F_{3,67} = 0,331$; $P = 0,803$	$\chi^2_3 = 1,640$; $P = 0,650$
Hembras Puras (No infectadas vs. Infectadas)	$t_{21} = -0,210$; $P = 0,835$	$U = 58$; $n_1 = 8$; $n_2 = 15$; $P = 0,925$
Hembras Cpp No infectadas vs. Infectadas	$t_8 = -0,243$; $P = 0,814$	$U = 9$; $n_1 = 3$; $n_2 = 7$; $P = 0,833$
Hembras Cpe No infectadas vs. Infectadas	$t_{11} = 0,011$; $P = 0,922$	$U = 17$; $n_1 = 5$; $n_2 = 8$; $P = 0,724$
Hembras No infectadas Cpp vs. Cpe	$t_6 = 0,949$; $P = 0,379$	$U = 7$; $n_1 = 3$; $n_2 = 5$; $P = 1,000$
Hembras Infectadas Cpp vs. Cpe	$t_{13} = 1,132$; $P = 0,278$	$U = 27$; $n_1 = 7$; $n_2 = 8$; $P = 0,955$
Hembras Totales (No infectadas vs. Infectadas)	$t_{107} = -0,049$; $P = 0,961$	$U = 1235$; $n_1 = 35$; $n_2 = 74$; $P = 0,697$
Hembras No infectadas Híbridas vs. Puras	$t_{33} = -0,146$; $P = 0,885$	$U = 87,5$; $n_1 = 27$; $n_2 = 8$; $P = 0,428$
Hembras Infectadas Híbridas vs. Puras	$t_{72} = 0,113$; $P = 0,910$	$U = 335,5$; $n_1 = 59$; $n_2 = 15$; $P = 0,150$

Los cruzamientos indicados explícitamente siguen la forma ($\varnothing \times \sigma$)

Se obtienen resultados similares cuando se comparan hembras puras implicadas en cruzamientos compatibles (Tabla 6.2.1). Entre hembras Cpp no infectadas e infectadas, no hay diferencias significativas en el número de huevos, ni en la proporción de embriones ($P = 0,814$ y $P = 0,833$, respectivamente). Tampoco se detectan diferencias significativas entre hembras Cpe no infectadas e infectadas ($P = 0,922$ y $P =$

0,724). Cuando se comparan las hembras no infectadas Cpp con las hembras no infectadas Cpe, no se encuentran diferencias significativas ($P = 0,379$ y $P = 1,000$) permitiendo la agrupación de dichas hembras puras, con independencia de su origen. Además, lo anterior también se aplica a las hembras puras infectadas ($P = 0,278$ y $P = 0,955$). Así pues, se pueden comparar las hembras no infectadas con las portadoras de *Wolbachia* independientemente de su origen. A pesar de aumentar así el tamaño de la muestra y, por tanto, la potencia estadística, siguen sin observarse diferencias significativas ($P = 0,835$ y $P = 0,925$). Por tanto, tampoco se le puede atribuir a la infección por *Wolbachia* un efecto sobre la producción de embriones en hembras puras.

Por último, no hay diferencias significativas entre hembras no infectadas híbridas o puras ($P = 0,885$ y $P = 0,428$), ni entre hembras infectadas procedentes del centro de la zona híbrida o de los extremos del transecto ($P = 0,910$ y $P = 0,150$). Cuando hembras híbridas y puras son agrupadas para aumentar el tamaño de las muestras, siguen sin observarse diferencias significativas entre hembras no infectadas e infectadas ($P = 0,961$ y $P = 0,697$).

6.3 Incompatibilidad citoplasmática inducida por *Wolbachia*.

Los cruzamientos realizados entre individuos híbridos muestran diferencias en la proporción de huevos que contienen embriones si se toma como factor de agrupación la categoría de compatibilidad en la que han sido clasificados (Tabla 6.1.1). Los cruzamientos híbridos compatibles producen una media de 0,772 embriones por huevo. Sin embargo, los cruzamientos híbridos susceptibles de sufrir IC unidireccional (hembras no infectadas cruzadas con machos infectados por cepas B y/o F) producen una media de 0,521 embriones por huevo. Esto supone una reducción del 32,5% en la proporción de embriones producidos. Estas diferencias en individuos híbridos entre cruzamientos compatibles e incompatibles unidireccionales está bien respaldada desde un punto de vista estadístico ($P < 0,001$. Tabla 6.3.1).

La capacidad de inducir IC unidireccional se ha analizado por separado para cada supergrupo. Los cruzamientos realizados entre hembras híbridas no infectadas y machos infectados por el supergrupo B producen una media de 0,517 embriones por huevo, observándose una reducción del 33% en las proporciones de embriones respecto

de los cruzamientos compatibles (Tabla 6.1.1). Al comparar estos cruzamientos con sus recíprocos ($\text{♀O} \times \text{B}^{\text{♂}}$ vs. $\text{♀B} \times \text{O}^{\text{♂}}$), se observan diferencias significativas, lo que respalda la existencia de IC unidireccional inducida por el supergrupo B ($P = 0,010$. Tabla 6.3.1). Por su parte, las hembras híbridas que portan bacterias del supergrupo F, cruzadas con machos no infectados, producen una media de 0,589 embriones por huevo (Tabla 6.1.1). En este último caso, se reduce la proporción de embriones en un 23,7% respecto de los cruzamientos compatibles. Sin embargo, las diferencias que encontramos entre los cruzamientos susceptibles de sufrir IC unidireccional inducida por el supergrupo F y los cruzamientos recíprocos ($\text{♀O} \times \text{F}^{\text{♂}}$ vs. $\text{♀F} \times \text{O}^{\text{♂}}$) no son estadísticamente significativas ($P = 0,181$. Tabla 6.3.1). No obstante, tampoco existen diferencias significativas entre ambos tipos de cruzamientos susceptibles de IC unidireccional ($\text{♀O} \times \text{B}^{\text{♂}}$ vs. $\text{♀O} \times \text{F}^{\text{♂}}$; $P = 0,607$; Tabla 6.3.1). De esta forma, aunque la IC unidireccional inducida por el supergrupo F no queda bien respaldada desde un punto de vista estadístico, tampoco es descartable, ya que se observa una importante reducción en la proporción de embriones y bastante similitud entre estos cruzamientos y los cruzamientos unidireccionales que implican al supergrupo B. La ambigüedad de los resultados podría responder a una falta de potencia estadística, como se discutirá más adelante.

Los cruzamientos entre individuos híbridos que portan diferente supergrupo de *Wolbachia* (candidatos a sufrir IC bidireccional) producen una media de 0,654 embriones por huevo, lo que supone una reducción del 15,3% respecto a los cruzamientos compatibles (Tabla 6.1.1). Las diferencias encontradas no son estadísticamente significativas ($P = 0,117$. Tabla 6.3.1). Sin embargo, tampoco existen diferencias significativas entre los cruzamientos híbridos bidireccionales y los unidireccionales ($P = 0,291$. Tabla 6.3.1). Como en el caso anterior, podemos encontrarnos ante una falta de potencia estadística para aceptar o rechazar la hipótesis de IC bidireccional.

Respecto a los cruzamientos entre individuos de los extremos de la zona híbrida (cruzamientos puros), se observan diferentes valores promedios en la proporción de embriones dependiendo de las distintas categorías de compatibilidad (Tabla 6.1.2). Los cruzamientos puros susceptibles de sufrir IC unidireccional muestran una reducción media del 6,2% en la proporción media de embriones respecto de los cruzamientos

Tabla 6.3.1. Comparaciones de la proporción de embriones de los distintos tipos de cruzamientos.

Tipo de cruzamiento	Embriones/Huevos
Cruzamientos entre individuos híbridos:	
Compatibles vs. Unidireccionales	U = 316,5; n ₁ = 86; n ₂ = 16; P = 0,001
Unidireccionales (OxB vs. OxF)	U = 22; n ₁ = 9; n ₂ = 6; P = 0,607
IC inducida por supergrupo B (OxB vs. BxO)	U = 52; n ₁ = 9; n ₂ = 27; P = 0,010
IC inducida por supergrupo F (OxF vs. FxO)	U = 15; n ₁ = 6; n ₂ = 9; P = 0,181
Bidireccionales vs. Compatibles	U = 228,5; n ₁ = 8; n ₂ = 86; P = 0,117
Bidireccional vs. Unidireccionales	U = 46,5; n ₁ = 8; n ₂ = 16; P = 0,291
Cruzamientos entre individuos puros:	
Compatibles vs. Unidireccionales (todos ellos OxF)	U = 38; n ₁ = 23; n ₂ = 4; P = 0,622
Compatibles (hembras Cpp vs. hembras Cpe)	U = 63; n ₁ = 10; n ₂ = 13; P = 0,927
CppxCpp vs. CppxCpe	U = 9; n ₁ = 6; n ₂ = 4; P = 0,610
CpexCpe vs. CpexCpp	U = 8; n ₁ = 8; n ₂ = 5; P = 0,093
Bidireccionales vs. Compatibles	U = 14; n ₁ = 4; n ₂ = 23; P = 0,027
Bidireccionales vs. Unidireccionales	U = 3; n ₁ = 4; n ₂ = 4; P = 0,200
Cruzamientos totales:	
Compatibles (híbridos vs. puros)	U = 774; n ₁ = 86; n ₂ = 23; P = 0,110
Unidireccionales (híbridos vs. puros)	U = 15; n ₁ = 16; n ₂ = 4; P = 0,122
IC inducida por supergrupo B (OxB vs. BxO)	U = 53; n ₁ = 9; n ₂ = 28; P = 0,008
IC inducida por supergrupo F (OxF vs. FxO)	U = 40; n ₁ = 10; n ₂ = 9; P = 0,720
Bidireccionales (híbridos vs. puros)	U = 8; n ₁ = 8; n ₂ = 4; P = 0,214
Compatibles vs. Unidireccionales	U = 650; n ₁ = 109; n ₂ = 20; P = 0,004
Bidireccionales vs. Compatibles	U = 358,5; n ₁ = 12; n ₂ = 109; P = 0,010
Bidireccional vs. Unidireccionales	U = 118,5; n ₁ = 12; n ₂ = 20; P = 0,954

Los cruzamientos indicados explícitamente siguen la forma (♀ x ♂)

puros compatibles (0,779 y 0,830 embriones por huevo, respectivamente). No obstante, estas diferencias no son estadísticamente significativas (P = 0,622. Tabla 6.3.1). En este punto hay que decir que, sin conocer *a priori* el tipo de infección de los parentales por el diseño experimental llevado a cabo, todos los cruzamientos unidireccionales puros obtenidos se han establecido por azar entre una hembra no infectada y un macho infectado por el supergrupo F. Por otro lado, los cruzamientos entre individuos puros con un tipo diferente de infección (IC bidireccional) mostraron una media de 0,369 embriones por huevo, lo cual, supone una reducción significativa del 55,5% con respecto a los cruzamientos puros compatibles (P = 0,027. Tabla 6.3.1).

El genotipo de los parentales (Cpp, Cpe o híbrido) no parece influir en las proporciones de embriones obtenidas en los distintos tipos de cruzamiento. Dentro de los cruzamientos compatibles puros (libres de sufrir IC inducida por *Wolbachia*) no se observan diferencias significativas entre hembras Cpp cruzadas con machos Cpe o Cpp ($P = 0,610$. Tabla 6.3.1). Un resultado similar se obtiene si se comparan hembras Cpe cruzadas con machos Cpe o Cpp ($P = 0,093$. Tabla 6.3.1). Una vez agrupados los cruzamientos según el origen de la hembra, y con independencia del macho con el que han sido cruzados, no se observan diferencias significativas en la proporción de embriones al comparar las hembras Cpp con las hembras Cpe ($P = 0,927$. Tabla 6.3.1). Cuando se comparan las proporciones de embriones entre cruzamientos híbridos y puros dentro de cada categoría de compatibilidad tampoco se observan diferencias significativas (compatibles, $P = 0,110$; unidireccionales, $P = 0,122$; bidireccionales, $P = 0,214$. Tabla 6.3.1).

Al no haberse encontrado un efecto asociado al factor genotipo en las proporciones de embriones, los cruzamientos pueden agruparse dentro de cada categoría de compatibilidad con independencia de la población de origen de los parentales. De este modo, el número de cruzamientos a comparar aumenta hasta 109 cruzamientos compatibles, 20 cruzamientos incompatibles unidireccionales y 12 cruzamientos incompatibles bidireccionales. En líneas generales, los resultados obtenidos al comparar las distintas categorías de compatibilidad son similares a los descritos anteriormente. Como ocurre en los cruzamientos híbridos, la IC unidireccional inducida por el supergrupo B queda estadísticamente bien respaldada pero no ocurre lo mismo con el supergrupo F ($P = 0,008$ y $P = 0,720$, respectivamente; Tabla 6.3.1). Sin embargo, tras la agrupación, los cruzamientos incompatibles bidireccionales sí que muestran diferencias significativas con los cruzamientos compatibles, aportando así evidencias de incompatibilidad citoplasmática inducida por diferentes cepas de *Wolbachia* ($P = 0,010$; Tabla 6.3.1). Finalmente, no se observan diferencias significativas entre los cruzamientos incompatibles bidireccionales y los cruzamientos incompatibles unidireccionales ($P = 0,954$; Tabla 6.3.1).

DINÁMICA DE LA INFECCIÓN EN *C. PARALLELUS*

7.1 Parámetros inferidos a partir de los cruzamientos.

Las distribuciones posteriores del número y de la proporción de embriones producidos, en promedio, por los distintos tipos de hembras y cruzamientos respaldan, de forma general, los resultados descritos anteriormente sobre los efectos de *Wolbachia*.

A partir de los números de embriones observados en los distintos tipos de hembras cruzadas con machos no infectados se han inferido las distribuciones posteriores, sus medias y sus intervalos de credibilidad al 95% (Tabla 7.1.1). Al representar gráficamente las funciones de densidad, se observa que el grado de solapamiento entre ellas es muy amplio (Figura 7.1.1).

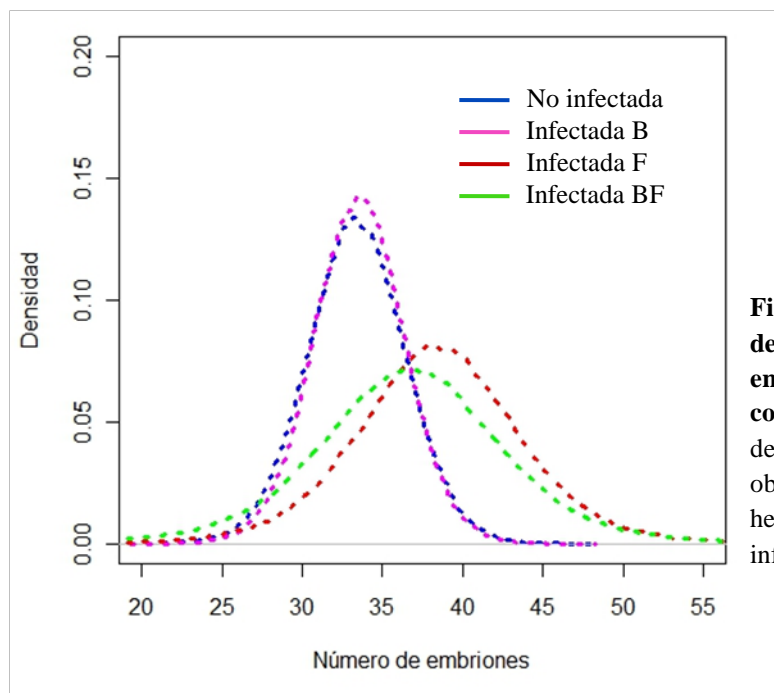


Figura 7.1.1. Funciones de densidad del número de embriones en cruzamientos compatibles, calculadas a partir de la distribuciones posteriores obtenidas para cada tipo de hembra cruzada con un macho no infectado (ver Tabla 7.1.1).

Tabla 7.1.1. Número de embriones en cruzamientos compatibles.

Tipo de cruzamiento	N	media	DS	C al 95%
OxO	27	33,39	3,09	27,33 - 39,48
BxO	27	33,54	2,88	27,85 - 39,22
FxO	9	38,43	5,53	27,32 - 49,51
BFxO	8	36,73	6,38	24,00 - 49,59

Los cruzamientos indicados siguen la forma ($\text{♀} \times \text{♂}$).
N, número de cruzamientos; DS, desviación estándar; C, intervalo de credibilidad.

El resultado mostrado nos recuerda que, estadísticamente, no podemos decir que existan diferencias significativas en la producción de embriones asociadas a la infección que presente la hembra. Sin embargo, al contar con las distribuciones posteriores, se pueden calcular ciertas probabilidades de interés. La probabilidad de que las hembras infectadas por el supergrupo B produzcan más embriones que las hembras no infectadas es $p = 0,517$, frente a la probabilidad complementaria de que produzcan igual o menos embriones $(1 - p) = q = 0,483$. Por tanto, la probabilidad a favor de que las hembras infectadas por el supergrupo B produzcan más embriones que las hembras no infectadas es 1,07 veces la probabilidad en contra (p / q). Es decir, son prácticamente iguales. Por otro lado, la probabilidad a favor de que las hembras infectadas por el supergrupo F produzcan más embriones que las hembras no infectadas es 3,96 veces la probabilidad en contra. Y, por último, la probabilidad a favor de que las hembras coinfectadas produzcan más embriones que las hembras no infectadas es 2,28 veces la probabilidad en contra.

Las distribuciones posteriores de la fecundidad relativa (F) para los distintos tipos de hembras infectadas muestran, lógicamente, resultados similares al basarse éstas en las distribuciones del número de embriones (Figura 7.1.2). Las medias y los intervalos de credibilidad para los distintos tipos de hembras están reflejados en la Tabla 7.1.2.

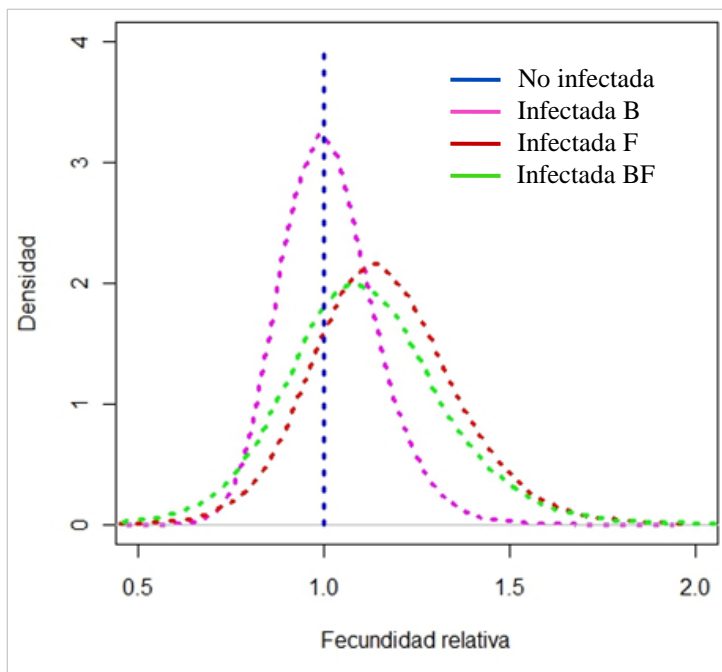


Figura 7.1.2. Funciones de densidad de la fecundidad relativa, calculadas a partir de la distribuciones posteriores del número de embriones obtenidas para cada tipo de hembra cruzada con un macho no infectado (ver Tablas 7.1.1 y 7.1.2). Dichas distribuciones posteriores son divididas por la distribución de las hembras no infectadas.

Tabla 7.1.2. Fecundidad relativa de los distintos tipos de hembras.

Tipo de hembra	Media	DS	C al 95%
F _o	1,000	-	-
F _b	1,013	0,131	0,783 – 1,295
F _f	1,161	0,201	0,792 – 1,589
F _{bf}	1,110	0,221	0,695 – 1,576

El subíndice indica el tipo de infección de la hembra.
DS, desviación estándar; C, intervalo de credibilidad.

A partir de la proporción de embriones observada en los distintos tipos de cruzamientos incompatibles se ha inferido las distribuciones posteriores y, sobre éstas, las medias y los intervalos de credibilidad al 95% (Tabla 7.1.3). Representando las funciones de densidad, se puede observar la ausencia de solapamiento de cualquiera de los tipos de cruzamientos incompatibles con los cruzamientos compatibles (Figura 7.1.3). Esto nos quiere decir que, en todos los tipos de cruzamientos incompatibles, se produce una reducción estadísticamente significativa en la producción de embriones con respecto a los cruzamientos compatibles.

Figura 7.1.3. Funciones de densidad de la proporción de embriones en los distintos tipos de cruzamientos, calculadas a partir de las distribuciones posteriores obtenidas para cada tipo de cruzamiento (ver Tabla 7.1.3). Los cruzamientos indicados siguen la forma (♀ x ♂).

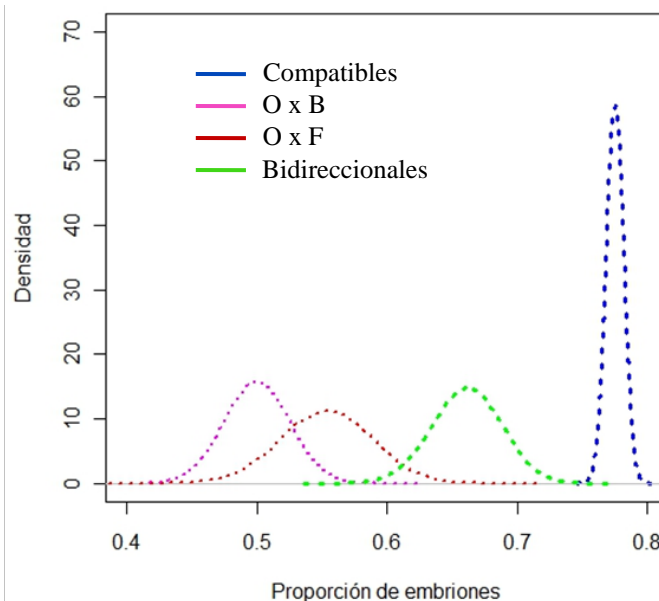


Tabla 7.1.3. Proporción de embriones.

Tipo de cruzamiento	N	media	DS	C al 95%
Compatibles	86	0.775	0.007	0.762 – 0.788
OxB	9	0.500	0.025	0.450 – 0.549
OxF	6	0.553	0.035	0.484 – 1,589
Bidireccionales	8	0.661	0.030	0.608 – 0.622

Los cruzamientos indicados siguen la forma (♀ x ♂).
N, número de cruzamientos; DS, desviación estándar; C, intervalo de credibilidad.

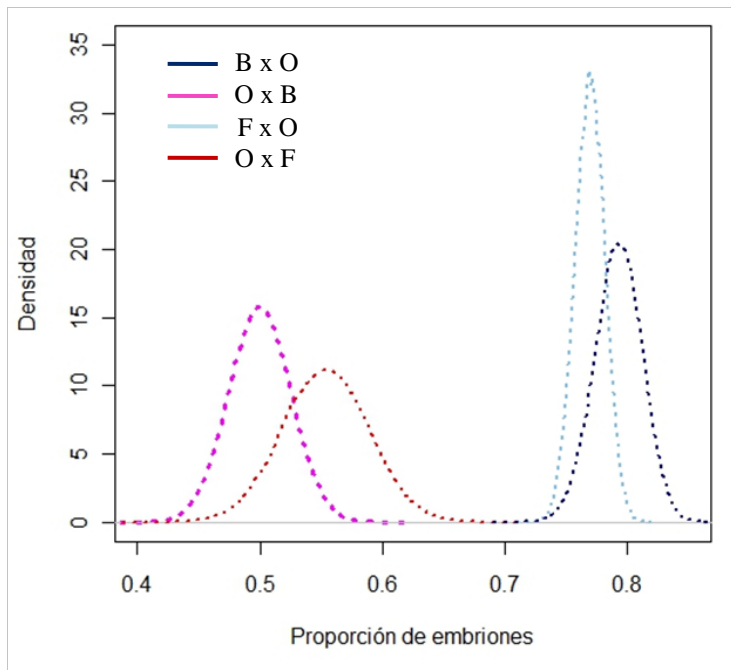


Figura 7.1.4. Funciones de densidad de la proporción de embriones en cruzaientos unidireccionales, calculadas a partir de las distribuciones posteriores obtenidas para dichos tipos de cruzaiento (ver Tablas 7.1.1 y 7.1.3). Los cruzaientos indicados siguen la forma ($\text{♀} \times \text{♂}$).

Si nos fijamos con más detalle en los cruzaientos incompatibles unidireccionales, y en sus cruzaientos compatibles recíprocos, observamos que las diferencias se siguen manteniendo (Figura 7.1.4).

Recordemos que la prueba U de Mann-Whitney no daba diferencias significativas entre los cruzaientos unidireccionales con implicación del supergrupo F y sus cruzaientos recíprocos; ni entre los cruzaientos incompatibles bidireccionales y los cruzaientos compatibles (Tabla 6.3.1). Existe, por tanto, discrepancia entre ambos resultados. En este punto, hay que tener en cuenta que, al construir las distribuciones posteriores de las proporciones de embriones, se ha utilizado una distribución beta. Esta distribución es un modelo muy adecuado para aproximar el comportamiento aleatorio de las proporciones basándose en el número de éxitos y fracasos. Sin embargo, no tiene en cuenta la variación que existe entre cruzaientos dentro del mismo grupo o tipo. Es decir, es como si todos los embriones y huevos hueros obtenidos dentro de un determinado tipo de cruzaiento provinieran de una única hembra y un único macho. Así pues, podemos afirmar que la discrepancia obtenida entre los distintos análisis refleja la gran heterogeneidad de los cruzaientos

unidireccionales con implicación del supergrupo F y de los cruzamientos bidireccionales. Por tanto, la falta de potencia observada en las pruebas U de Mann-Whitney sería debida a la variabilidad existente entre cruzamientos dentro del mismo grupo y no a la ausencia de una reducción significativa en la proporción de embriones obtenidos en el conjunto.

En la Figura 7.1.5 se muestran las funciones de densidad de las distribuciones posteriores de la variable tasa de eclosión (H) para los distintos tipos de cruzamientos. Las medias y los intervalos de credibilidad para los distintos tipos de cruzamientos están reflejados en la Tabla 7.1.4.

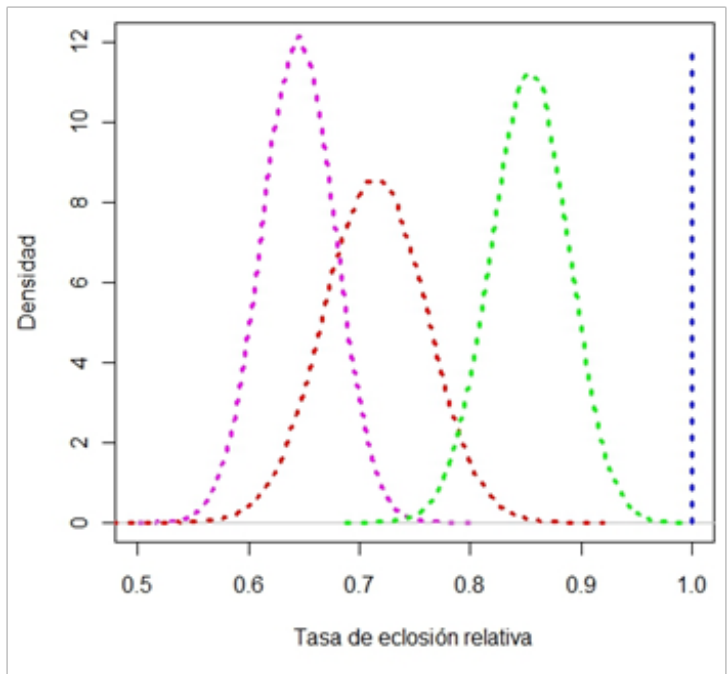


Figura 7.1.5. Funciones de densidad de la tasa de eclosión relativa, calculadas a partir de la distribuciones posteriores del número de embriones obtenidas para cada tipo de cruzamiento (ver Tabla 7.1.4). Dichas distribuciones posteriores son divididas por la distribución de los cruzamientos compatibles.

Tabla 7.1.4. Tasa de eclosión relativa de los distintos tipos de cruzamientos.

Tipo de cruzamientos	Media	DS	C al 95%
H _O	1,000	-	-
H _{UNIb}	0,645	0,033	0,580 – 0,710
H _{UNIf}	0,714	0,046	0,624 – 0,804
H _{BI}	0,853	0,035	0,783 – 0,922

El subíndice indica el tipo de cruzamiento: O, cruzamientos compatibles; UNIb, ♀OxB♂; UNIf, ♀OxF♂; BI, bidireccionales.

DS, desviación estándar; C, intervalo de credibilidad.

7.2 La infección en el equilibrio.

Los resultados expuestos anteriormente sobre los cruzamientos respaldan la existencia de IC bidireccional. Bajo esta circunstancia, uno de los equilibrios posibles en la dinámica de infección es aquel escenario donde la coinfección es mayoritaria, manteniéndose el polimorfismo de la infección de forma estable a lo largo del tiempo (apartado 3.3). Dados los resultados de las frecuencias de infección, Sallent de Gállego presenta unos valores que bien podrían responder a este escenario. En esta población, la infección es extremadamente común (más del 95% de los individuos están infectados) y presenta los valores de coinfección más altos de entre todas las poblaciones estudiadas (más del 68% de los individuos portan ambos supergrupos). Bajo el supuesto de que la infección en Sallent de Gállego está en el equilibrio, se han calculado las distribuciones de la tasa de transmisión vertical ($1 - \mu$) para ambos supergrupos.

Asumiendo que la fecundidad es similar entre los distintos tipos de hembras ($F_o = F_b = F_f = F_{bf} = 1$), se obtienen valores ajustados de μ entre 0 y 1 para todas las combinaciones de los valores que H puede tomar dentro de las distribuciones posteriores establecidas (H_o , H_{UNib} , H_{UNIf} , H_{BI}). Por tanto, se podría dar el equilibrio en Sallent de Gállego, con una probabilidad de $P = 1,000$, si las tasas de transmisión vertical para el supergrupo B y F toman valores comprendidos en las distribuciones calculadas para μ_b y μ_f (Tabla 7.2.1). Para el supergrupo B, el porcentaje promedio de descendientes que heredan la infección es del 98,4% ($\mu_b = 0,016$; intervalo de credibilidad al 95% = 0,009 - 0,025). Este porcentaje es ligeramente inferior en el caso de las bacterias pertenecientes al supergrupo F, donde el 96,9% de los descendientes de hembras infectadas portarán también *Wolbachia* ($\mu_f = 0,031$; intervalo de credibilidad al 95% = 0,016 - 0,047).

Cuando introducimos incertidumbre en la fecundidad de las hembras, la probabilidad de encontrar valores de μ entre 0 y 1 que permitan el equilibrio en Sallent de Gállego cae a $P = 0,582$. Esto nos indica que no todas las combinaciones de los valores que F y H pueden tomar dentro de sus distribuciones posteriores permiten dicho equilibrio en ausencia de otros factores como la transferencia horizontal de la infección, herencia paterna o migración. Excluyendo aquellas combinaciones en las que el equilibrio no es posible, las distribuciones de F y H pueden verse modificadas (Tabla 7.2.1). En concreto, la distribución que se ve más sesgada es la de la fecundidad de las

hembras coinfectadas (F_{bf}), que sufre un desplazamiento evidente hacia los valores más altos. El resto de distribuciones no experimentan apenas modificación alguna. Por otra parte, las tasas de transmisión necesarias para mantener el equilibrio se relajan para ambos supergrupos. En el caso del supergrupo B, el 97,6% de la descendencia portaría la infección ($\mu_b = 0,024$; intervalo de credibilidad al 95% = 0,001 - 0,055). En el caso del supergrupo F, el 92,7% de los descendientes heredaría la bacteria ($\mu_f = 0,073$; intervalo de credibilidad al 95% = 0,016 - 0,139).

Tabla 7.2.1. Variables del modelo en el equilibrio.

	Sin incertidumbre en F		Con incertidumbre en F	
	Mediana	C al 95%	Mediana	C al 95%
F_b	1	-	0.991	0.776 - 1.241
F_f	1	-	1.100	0.766 - 1.426
F_{bf}	1	-	1.203	0.944 - 1.652
H_{UNib}	0.645	0.580 - 0.710	0.645	0.580 - 0.709
H_{UNIf}	0.714	0.624 - 0.804	0.714	0.624 - 0.803
H_{BI}	0.853	0.783 - 0.922	0.850	0.780 - 0.918
μ_b	0.016	0.009 - 0.025	0.024	0.001 - 0.055
μ_f	0.031	0.016 - 0.047	0.073	0.016 - 0.139

El subíndice indica el tipo de hembra o de cruzamiento; en el último caso, de la misma forma que en la Tabla 7.1.4.

C, intervalo de credibilidad.

7.3 Simulación de la dinámica de la infección.

Con las estimaciones obtenidas de F , H y μ se puede determinar el porcentaje mínimo de individuos infectados necesario para que un determinado tipo de infección se extienda en una población. De igual manera, se puede explorar la evolución de la infección en dicho escenario.

Asumiendo igual fecundidad para todos los tipos de hembras y las distribuciones de los otros parámetros estimados en el equilibrio (Tabla 7.2.1), la frecuencia mínima de individuos infectados por el supergrupo B es del 4,9% del total de una población con ausencia de infección previa. Sobre este umbral, la infección se extendería y alcanzaría

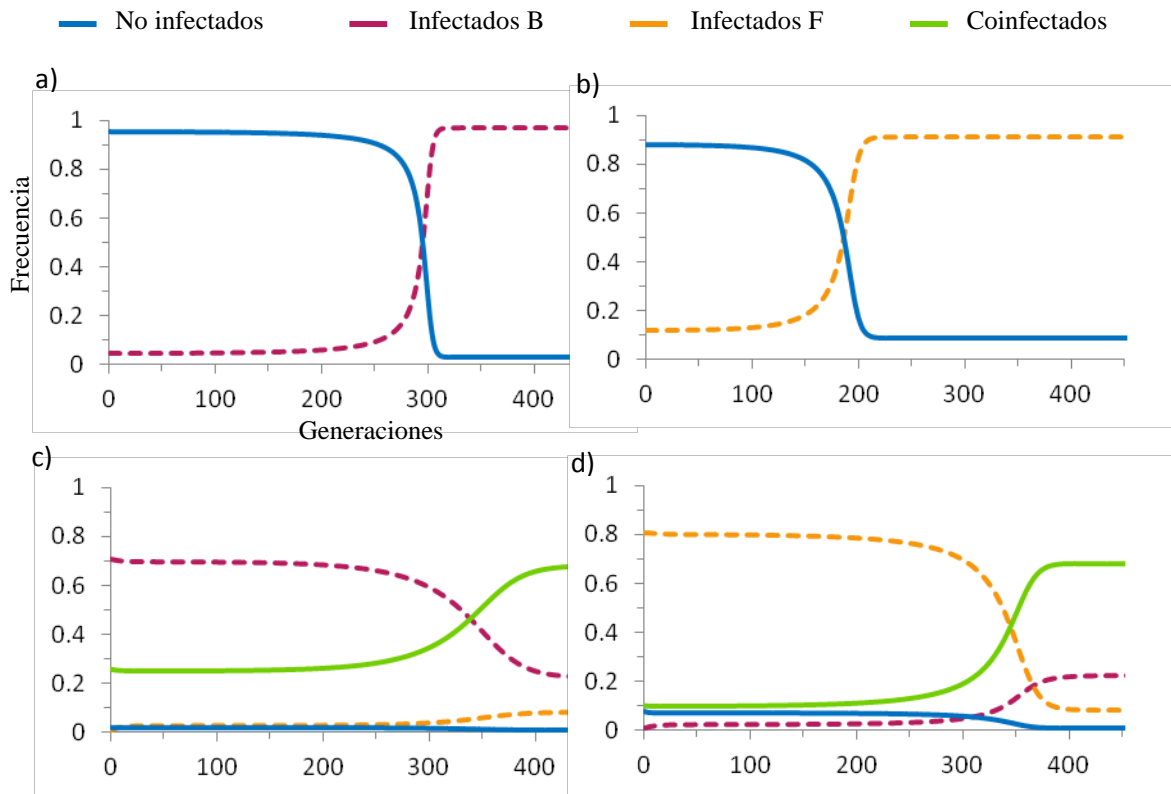


Tabla 7.3.1. Dinámica de la infección con igual fecundidad para todas las hembras.

al 96,8% de los individuos de la población tras 320 generaciones, aproximadamente (Figura 7.3.1a), en ausencia de otros factores que puedan afectar al proceso. En el caso del supergrupo F, la infección mínima necesaria para mantenerse y extenderse en una población sin infección previa, se estima en el 12,2% de los individuos. Por encima de este porcentaje, la infección alcanzaría un equilibrio estable después de 220 generaciones, afectando al 91,1% de la población (Figura 7.3.1b). Una vez alcanzado el equilibrio estable, la superinfección en una población previamente infectada por el supergrupo B requeriría que, como mínimo, un 26,9% de los individuos fueran infectados por el supergrupo F (Figura 7.3.1c). En el caso de una población donde la infección por el supergrupo F esté en el equilibrio, el 11,3% de los individuos deberían de adquirir la nueva infección por el supergrupo B para permitir la superinfección a largo plazo (Figura 7.3.1d). En cualquiera de los escenarios de superinfección, los individuos coinfectados representarían la clase de infección mayoritaria una vez alcanzado el equilibrio estable en 450 y 390 generaciones, respectivamente. Por debajo de los umbrales indicados anteriormente, cualquiera de las cepas recién incorporadas en la población desaparecería tarde o temprano.

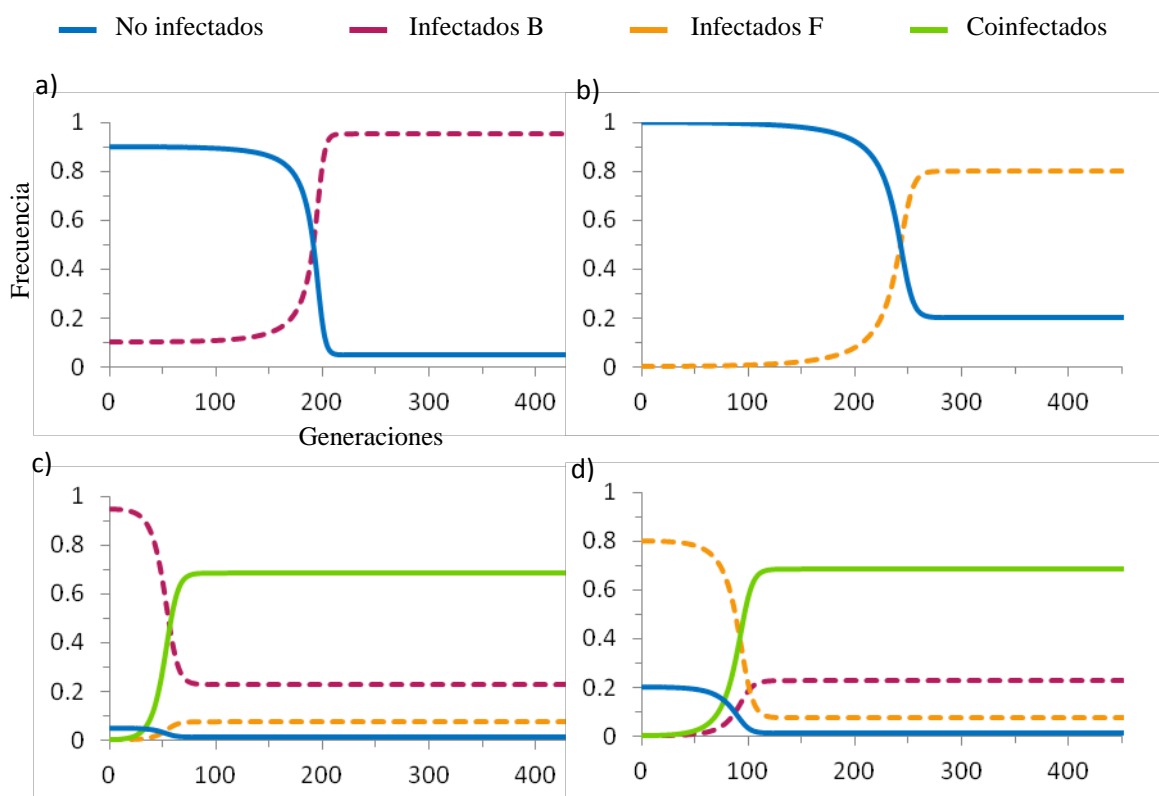


Tabla 7.3.2. Dinámica de la infección con incertidumbre en la fecundidad de las hembras.

Al introducir incertidumbre en la fecundidad de las hembras, las distribuciones de los parámetros deben de incluir sólo aquellas réplicas que permitan el equilibrio, y que representan el 58,2% del total (Tabla 7.2.1). La infección mínima para el supergrupo B se sitúa en el 10% en una población que esté libre de infección previa. Por encima de ese porcentaje, la infección se extendería y alcanzaría el equilibrio estable tras 218 generaciones afectando al 95,1% de la población (Figura 7.3.2a). En el caso del supergrupo F, el umbral de la infección mínima cae al 0,1% en una población que carece de infección previa, llegando a afectar al 80% de los individuos una vez alcanzado el equilibrio después de 280 generaciones (Figura 7.3.2b). En ambos contextos de equilibrio estable, los umbrales mínimos para permitir la superinfección a largo plazo, así como el tiempo requerido para alcanzar el equilibrio del polimorfismo de infección, son mucho menores en este caso que en cualquier otro escenario. Ambos supergrupos se extenderían en una población previamente infectada con la cepa alternativa alcanzando tan sólo el 0,1% de la población. La coinfección se convertiría en la categoría de infección más frecuente una vez alcanzado el equilibrio tras 90 o 129 generaciones, en el caso de la superinfección por F o B, respectivamente (Figura 7.3.2c y 7.3.2d).

DISCUSIÓN

8.1 Diversidad encontrada en *Wolbachia*.

Wolbachia muestra variabilidad en la secuencia del gen *16S rRNA* permitiéndonos distinguir 6 variantes de esta bacteria implicadas en la infección de *C. parallelus*. Debido a su baja tasa de mutación, el uso de este gen está muy extendido para la identificación de taxones a nivel de género. Además, permite establecer grupos fuera de rango taxonómico como los “r-clusters” en *Pseudomonas* (Bodilis *et al.*, 2004) o los distintos clados definidos en *Bradyrhizobium* (Menna *et al.*, 2006). En el caso de *Wolbachia*, dichos grupos corresponden a los supergrupos A-K comentados en la Introducción (apartado [3.1](#)). Sin embargo, el uso del gen *16S rRNA* no está recomendado para la identificación de especies, precisamente por su baja tasa de mutación. Además, fenómenos como la recombinación o la transferencia horizontal pueden conducir a filogenias erróneas cuando están basadas en un único gen. Es por ello que se recomienda el uso simultáneo de varios genes repartidos por el genoma que amortigüen los efectos de tales fenómenos (Stackebrandt *et al.*, 2002).

En los últimos años, se han desarrollado técnicas de análisis de secuencias multilocus (del inglés, MLSA) basadas en varios genes para resolver las filogenias con una alta resolución y fiabilidad (para una revisión del tema: Glaeser & Kämpfer, 2015). En el caso de *Wolbachia*, se ha desarrollado un sistema para identificar distintas cepas bacterianas (MLST, del inglés *MultiLocus Sequence Typing*) que respaldan la existencia de los supergrupos detectados con el *16S rRNA* (Baldo *et al.*, 2006). En estudios recientes se ha aplicado la técnica del MLST para caracterizar la infección de *Wolbachia* en *C. parallelus* (Martínez-Rodríguez, 2013). Los resultados obtenidos respaldan la variabilidad encontrada en este trabajo mediante el gen *16S rRNA*, coincidiendo las filogenias construidas con este gen y aquellas basadas en los genes usados en el MLST.

Las secuencias del *16S rRNA* detectadas en las poblaciones de *C. parallelus* aparecen adscritas a los supergrupos B y F de *Wolbachia* en la filogenia obtenida (Figura 4. Filogenia). El supergrupo B, al que pertenecen dos de las secuencias, es uno de los supergrupos más extendidos en la naturaleza estando presente en otras muchas especies de artrópodos. Su modo de vida es típicamente parasitario induciendo a

menudo alteraciones como la IC (Fenn & Blaxter, 2006; Bordenstein *et al.*, 2009). El supergrupo F, en el que se incluyen 4 de las secuencias obtenidas en *C. parallelus*, infecta tanto a especies de artrópodos como a especies de nematodos. Existen en la literatura muchas menos evidencias acerca de su modo de vida, y los efectos que produce en las especies a las que infecta no están claros (Lo *et al.*, 2002; Rasgon & Scott, 2004; Casiraghi *et al.*, 2005).

A pesar de las dificultades para enraizar los árboles filogenéticos y poder situar el estado ancestral más antiguo entre mutualismo y parasitismo, las filogenias construidas con todos los supergrupos conocidos de *Wolbachia* reflejan que los modos de vida parecen mantenerse de forma consistente dentro de los diferentes supergrupos (Fenn & Blaxter, 2006; Lo *et al.*, 2007; Bordenstein *et al.*, 2009). Por tanto, la presencia del supergrupo B en *C. parallelus* pone de manifiesto la existencia de cepas potencialmente capaces de producir alteraciones reproductivas. No podemos dejar de lado que bacterias pertenecientes a estos dos supergrupos (B y F), conviven a menudo en un mismo individuo de la especie aquí estudiada, lo que supone la existencia de 4 clases: infectados por B, infectados por F, coinfectados BF y no-infectados. Esto representa una complejidad superior a lo que podíamos esperar al enfrentar este estudio.

La variabilidad encontrada en este estudio dentro del supergrupo B (2 variantes) es menor que la encontrada en el supergrupo F (4 variantes). Estas proporciones relativas se observan también al aplicar el sistema MLST (Martínez-Rodríguez, 2013). Según esta última metodología se pueden diferenciar 33 cepas, si bien 19 de ellas parecen ser resultado de la recombinación entre los supergrupos B y F. Estas 33 cepas se agrupan en 5 complejos ST (del inglés, *sequence type complex*): 2 de ellos adscritos al supergrupo B (13 cepas muy parecidas entre sí) y 3 adjudicados al supergrupo F (20 cepas con gran diversidad). En estos mismos estudios, se analiza el gen *wsp* de *Wolbachia* que arroja dos variantes para el supergrupo B y 4 para el supergrupo F, al igual que en el caso del gen *16S rRNA* utilizado en la presente tesis.

La antigüedad de la infección es una de las posibles explicaciones a la diversidad existente dentro de los supergrupos que infectan a *C. parallelus*. Cepas ancestrales habrían divergido generando la diversidad que encontramos en la actualidad; a mayor antigüedad de la infección, mayor potencial de diversificación. En este caso, podrían ser detectados procesos de codivergencia entre la bacteria y el saltamontes (Figura 8.1.1).

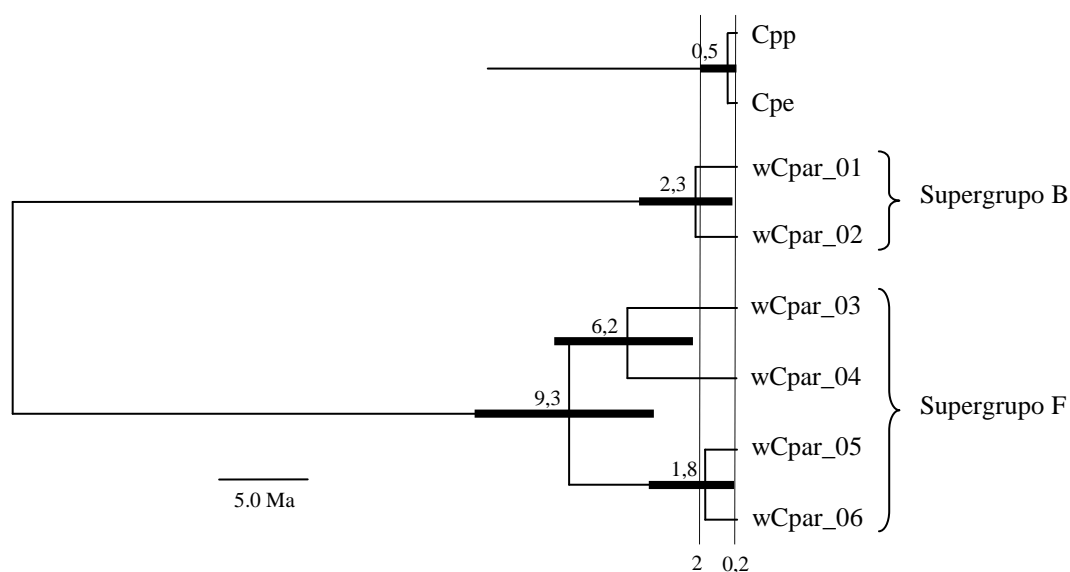


Figura 8.1.1. Codivergencia de *Wolbachia* y *C. parallelus*. Se muestra el árbol filogenético de las cepas de la bacteria con los tiempos de divergencia calculados a partir de las secuencias obtenidas del gen *16S rRNA*. Las barras gruesas representan el intervalo de credibilidad al 95%. Las líneas verticales discontinuas representan los límites del intervalo para el tiempo de divergencia entre Cpp y Cpe (0,2 - 2 Ma).

Las subespecies *C. p. parallelus* y *C. p. erythropus* empezaron a divergir hace unos 0,5 Ma, en algún momento comprendido entre 0,2 y 2 Ma antes del momento actual. Basándonos en la variabilidad encontrada en las secuencias del gen *16S rRNA*, las cepas *wCpar_01* y *wCpar_02* del supergrupo B (tiempo de divergencia: 0,3 - 5,6 Ma) podrían ser el resultado de la codivergencia de una cepa ancestral y *C. parallelus*, pues los intervalos en los que se encuentran sus tiempos de divergencia solapan. El hecho de que dichas cepas se hayan secuenciado en las poblaciones de Escarrilla (Cpe) y Gabas (Cpp), respectivamente, anima a aceptar esta hipótesis. No obstante, el número de individuos secuenciados no permite dibujar la distribución geográfica de las distintas cepas con certeza, por lo que cualquier asunción al respecto ha de plantearse con cautela.

También se puede argumentar la codivergencia entre la bacteria y el saltamontes en el caso de las cepas *wCpar_05* y *wCpar_06* (tiempo de divergencia: 0,1 - 4,9 Ma) del supergrupo F. Sin embargo, esta hipótesis no puede explicar las diferencias encontradas entre las secuencias de las cepas *wCpar_03* y *wCpar_04* (tiempo de divergencia: 2,7 - 10,9 Ma). Tampoco se puede suponer que una única cepa ancestral se haya diversificado originando las 4 cepas dentro del supergrupo F (tiempo de divergencia: 4,9 - 14,8 Ma), al mismo tiempo que Cpp y Cpe divergieron. Quizás la infección es

mucho más antigua que el momento en que *C. parallelus* empezó a divergir y que existan otras cepas que no han sido detectadas, o que hayan sido eliminadas por selección. La exploración de la infección en otras subespecies de *C. parallelus*, o en especies hermanas como *C. montanus*, y un muestreo más exhaustivo podrían arrojar luz sobre este punto.

Por otra parte, en la filogenia obtenida para los supergrupos de *Wolbachia* (Figura 5.1.1), se puede observar un grupo monofilético formado por las cepas *wCpar_05* y *wCpar_06* del supergrupo F, mientras que las cepas *wCpar_03* y *wCpar_04* se agrupan con otras bacterias del mismo supergrupo pero que no presentes en *C. parallelus*. Esto puede reflejar un origen distinto para cada par de cepas mencionado. Por otro lado, las cepas *wCpar_01* y *wCpar_02* forman un grupo monofilético dentro del supergrupo B, lo que apoya la idea de un origen común. Además, aunque no podemos hacer una correlación exacta, los resultados obtenidos con el MLST reflejan una situación similar (Martínez-Rodríguez, 2013). Entre las cepas del supergrupo B típicas de Cpp y de Cpe existen tiempos de divergencia de 0,2 - 0,9 Ma, mientras que, en el supergrupo F son del orden de 2,5 - 6 Ma.

Así pues, la codivergencia entre *Wolbachia* y *C. parallelus* puede haber motivado la aparición de las cepas *wCpar_01* y *wCpar_02* (supergrupo B) y de las cepas *wCpar_05* y *wCpar_06* (supergrupo F). Estos resultados apuntan a que ambos supergrupos estaban presentes en las subespecies antes de formarse la zona híbrida y que *Wolbachia* podría estar influenciando su dinámica desde entonces. Existen más evidencias de que la presencia de ambos supergrupos en *C. parallelus* es antigua. En estudios recientes, se ha observado que ha habido intercambio de material genético entre *Wolbachia* y el saltamontes (Funkhouser-Jones *et al.*, pendiente de publicación). La secuenciación del genoma completo de varios individuos de *C. parallelus* en los que, mediante la amplificación del gen *16S rRNA*, se había comprobado previamente que no estaban infectados, pone de manifiesto la integración de fragmentos procedentes del genoma de *Wolbachia*. Estos resultados están respaldados mediante la técnica de hibridación *in situ* de fluorescencia (del inglés, FISH) que ha permitido visualizar dichos fragmentos sobre los cromosomas del ortóptero, no observándose señal alguna en el citoplasma. (Toribio, 2014).

Otra de las posibles causas para explicar la diversidad observada en *Wolbachia*, es la adquisición de nuevas cepas mediante transferencia horizontal. Por ejemplo, se ha comprobado que el parasitoide *Nasonia* actúa como un eficiente vector de transmisión entre poblaciones de *Bemisia tabaco* (Ahmed *et al.*, 2015). *C. parallelus* es parasitado por algunas especies de taquínidos y nematomorfos que podrían constituir el vector para dicha transferencia. Martínez-Rodríguez (2013) realizó un riguroso trabajo para evitar contaminaciones cruzadas, donde se analizaban aquellos casos en los que el saltamontes y los parasitoides mostraban diferente estado de infección. Se comprobó que dichos parasitoides están infectados por cepas de *Wolbachia* pertenecientes tanto al supergrupo B como al F, y que son parecidas a las encontradas en el saltamontes. Las estrictas condiciones con las que se llevó a cabo el estudio conllevan una dificultad adicional a la hora de caracterizar toda la diversidad en el parasitoide y de compararla con la del saltamontes. A pesar de esta situación, la similitud de las cepas y las frecuencias de infección encontradas sugieren que, efectivamente, ambas especies parasitoides podrían funcionar como posibles vectores de transmisión horizontal. Estos resultados abren la puerta, no sólo al intercambio de cepas entre dos actores, sino a la adquisición de nuevas cepas procedentes de otras especies también parasitadas. Este escenario podría explicar la falta de monofilia entre cepas, como ocurre en el caso de *wCpar_03* y *wCpar_04*, dentro del supergrupo F.

8.2 Características generales de la infección en las poblaciones estudiadas.

El análisis de la infección presente en las poblaciones, tomando el sexo de los individuos como factor de agrupación, indica que no existen diferencias entre machos y hembras en ninguna de las localidades analizadas con la excepción de dos muestras. Por el contrario, en caso de encontrarse un exceso de hembras infectadas, esto podría estar indicando un efecto de feminización de individuos genéticamente determinados como machos, la muerte selectiva de éstos o de partenogénesis inducida por *Wolbachia* (para una revisión del tema: Werren *et al.*, 2008). En organismos haplodiploides, cierto tipo de IC inducida por *Wolbachia* puede provocar un exceso en la proporción de machos producidos en determinados cruzamientos. En dicho escenario, cabría esperar progenies con un exceso de machos que presentarán el mismo tipo de infección que la hembra parental. Este efecto inducido por *Wolbachia* puede provocar también diferencias en las

frecuencias de infección entre machos y hembras. El caso de *Nasonia*, donde los machos son haploides y las hembras diploides, constituye un buen ejemplo en el que se ha comprobado la producción de progenies con un exceso de machos debido a la infección (Vavre *et al.*, 2000; Bordenstein *et al.*, 2003). Al tener lugar la IC, el pronúcleo masculino no se fusiona con el femenino. En este caso, los embriones no mueren pero como consecuencia se producen descendientes haploides y que, por tanto, son machos debido a su determinismo sexual haplodiploide.

Al no observarse diferencias generalizadas en las frecuencias de infección entre los sexos, se puede descartar que la bacteria esté provocando en *C. parallelus* alguno de los efectos comentados anteriormente. Además, esta conclusión viene respaldada por el amplio número de estudios realizados previamente, tanto en poblaciones naturales como en experimentos de laboratorio, en los que nunca se han observado indicios de las consecuencias que dichos efectos provocarían: hembras con dotación cromosómica masculina (feminización), progenies formadas únicamente por hembras (partenogénesis) o con una mayor proporción de ellas (muerte selectiva de machos). En *C. parallelus*, sólo se ha observado una desviación en la ratio de los sexos en las descendencias obtenidas en determinados cruzamientos establecidos por Bella *et al.* (1992). En este caso, se observó un exceso de machos respecto a lo esperado. Sin embargo, dicha desviación no se puede relacionar con los efectos inducidos por *Wolbachia* descritos en sistemas haplodiploides, como en el caso de *Nasonia*, debido a que *C. parallelus* es un organismo diploide.

Por otra parte, los test de independencia muestran una asociación entre las cepas de los supergrupos B y F, detectada por el exceso de individuos que están infectados por ambos supergrupos, respecto de lo esperado si se combinaran aleatoriamente. Dado que los resultados siempre se desvían en la misma dirección, se puede concluir que existe alguna fuerza que promueve la coinfección. Entre dichas fuerzas bien pudiera estar la IC bidireccional que daría ventaja a las hembras coinfectadas frente al resto de hembras, produciendo progenies más numerosas, y extendiendo con ello la coinfección (Werren, 1997; Serbus *et al.*, 2008).

Sin embargo, los posibles mecanismos que pueden estar dirigiendo la infección en *C. parallelus* no producen cambios de frecuencias tan radicales como para observar una tendencia clara en la evolución temporal de la infección durante el intervalo de

tiempo estudiado. Este saltamontes tiene un ciclo de vida anual y, quizás, lo sorprendente hubiera sido encontrar dichas tendencias pues la ventana temporal estudiada incluye tan sólo 5 generaciones. Dado que la infección por *Wolbachia* no parece reciente, cabe la posibilidad de que la infección se haya estabilizado en torno a aquellas frecuencias de infección que determinen las condiciones presentes en cada población. Por el contrario, encontrar tendencias claras en un periodo de tiempo tan corto reflejaría una situación muy alejada de dicha estabilidad y, por tanto, apuntaría hacia un origen reciente de la infección. Además, existen muchos factores que pueden provocar el comportamiento observado de las frecuencias de infección. Factores como la temperatura, antibióticos naturales ingeridos con el alimento, la respuesta inmune del hospedador y otras variables ecológicas o estacionales tienen una gran influencia sobre la bacteria (Werren, 1997; Serbus *et al.*, 2008). Por otra parte, se han analizado más años en el trabajo realizado por Martínez-Rodríguez (2013), ampliándose el periodo de tiempo estudiado, y en los que se apunta a la estabilidad de la infección con variaciones oscilantes entorno a un punto de equilibrio.

8.3 Diferencias en la infección entre *C. p. parallelus* y *C. p. erythropus*.

Las características de la infección presentes en Cpp difieren notoriamente de las existentes en Cpe, a la vez que las poblaciones pertenecientes a una misma subespecie comparten rasgos similares. De hecho, las frecuencias de infección observadas en las poblaciones puras de Cpp y Cpe definen los dos patrones geográficos, claramente diferenciados, descritos al norte y al sur de los Pirineos, respectivamente (Figura 10. Mapa patrones de infección). Resulta llamativa la distribución espacial observada, manteniéndose frecuencias similares dentro de cada patrón a pesar de la distancia que separa a las poblaciones que incluye. Esta aparente homogeneidad dentro de cada subespecie vuelve a recordar, como en el apartado anterior, a una situación de equilibrio de la infección.

La principal diferencia entre las subespecies puede resumirse en la gran incidencia de la infección en Cpe y su baja frecuencia en Cpp. Si en el origen de la zona híbrida las características de la infección eran las mismas que las observadas actualmente, *Wolbachia* podría haber inducido, principalmente, IC unidireccional

contribuyendo así a reducir el flujo génico en la zona híbrida. La mayor parte de los cruzamientos entre las subespecies implicarían a individuos Cpp no infectados e individuos Cpe infectados. En esta situación, los cruzamientos entre hembras Cpp no infectadas y machos Cpe infectados se verían afectados por la IC inducida por *Wolbachia*. Sin embargo, no habría ninguna barrera reproductiva en aquellos cruzamientos establecidos entre las hembras infectadas Cpe con los machos Cpp. Las hembras Cpe producirían más híbridos que las hembras Cpp y el flujo génico entre las subespecies sería asimétrico, lo que traería consigo consecuencias asociadas.

El escenario descrito presenta cierto paralelismo con los resultados obtenidos por Bella *et al.* (1992) y en los que se describe una homogamia asimétrica (apartado [2.3](#)); una mayor tendencia de las hembras Cpp para producir descendientes puros que no es tan evidente en las hembras Cpe. Los individuos elegidos para los cruzamientos procedían de las poblaciones de Gabas (Cpp) y Sallent de Gállego (Cpe?) analizadas en la presente tesis. Dichas poblaciones se caracterizan por presentar una incidencia de infección relativamente baja (patrón del norte) y una infección masiva (patrón de Sallent), respectivamente. Cuando se llevaron a cabo los cruzamientos, se desconocía el estado de infección aquí descrito, aunque podemos pensar que las frecuencias de infección en estas poblaciones probablemente no fueran muy distintas a las actuales, pudiendo explicar esta infección diferencial los resultados obtenidos entonces.

Tradicionalmente se ha rechazado la idea de que la IC unidireccional pudiera promover la especiación (Bordestein *et al.*, 2001). Por el contrario, sí se acepta el papel de *Wolbachia* en la especiación en sistemas como el de *Nasonia* donde existe infección diferencial entre especies, la incidencia de la infección es muy alta y existe IC bidireccional completa entre ellas. Sin embargo, hay modelos teóricos que defienden que la IC unidireccional podría también promover la especiación, incluso de forma más estable en el tiempo que la IC bidireccional, bajo determinadas circunstancias (Telschow *et al.*, 2007). En una situación en la que exista IC unidireccional pueden seleccionarse, mediante reforzamiento (apartado [1.2](#)), mecanismos que eviten el apareamiento entre hembras no infectadas y machos infectados. Dados los patrones de infección encontrados en las subespecies estudiadas, las consecuencias en el origen de la zona híbrida pudieron haber consistido en la aparición de reforzamiento para evitar cruzamientos entre hembras Cpp y machos Cpe tras el contacto secundario. De nuevo

podríamos encontrar asimetría en ciertos caracteres, como la elección de pareja, dado que las hembras Cpe infectadas no se verían afectadas por la IC unidireccional en ningún caso.

La elección de pareja ha sido estudiada en la zona híbrida de Pirineos aunque en un transecto diferente del que se desconoce el estado de la infección (Ritchie *et al.*, 1989; Butlin & Ritchie, 1991). Las hembras, tanto Cpp como Cpe, muestran preferencia por aparearse con los machos de su misma subespecie. Resulta interesante que, en el lado Cpp del transecto, haya indicios de una mayor preferencia en poblaciones más cercanas al punto de transición hacia el lado Cpe que en poblaciones más alejadas (Butlin & Ritchie, 1991). El gradiente observado podría coincidir con la posibilidad de encontrarse machos infectados y sufrir IC unidireccional. Por su parte, no se observa variación en las hembras del lado Cpe.

Los argumentos expuestos resultan muy sugerentes pero sería necesario realizar los experimentos oportunos para demostrar que la IC unidireccional es la responsable de las asimetrías detectadas: en el caso de la homogamia asimétrica, conociendo el estado de infección de los individuos utilizados en los cruzamientos; y en el caso de las diferencias en la intensidad en la elección de parejas, comparando cruzamientos entre machos y hembras procedentes de poblaciones donde exista o no posibilidad de IC unidireccional. Concluir que la infección es la responsable de estos fenómenos, o de sus asimetrías, es claramente especulativo con los datos disponibles en la actualidad. Por ejemplo, la homogamia ha sido también detectada en la zona híbrida que dos razas de *Podisma pedestris* forman en los Alpes, reflejando que no es un fenómeno exclusivo de *C. parallelus* (Hewitt *et al.*, 1987b). Sin embargo, no parece que en *Podisma* se observara ningún tipo de asimetría como la detectada en el caso de *C. parallelus*.

8.4 Variación de la infección en el transecto estudiado.

Las poblaciones dentro del transecto estudiado de la zona híbrida muestran frecuencias de infección parecidas desde Gabas hasta Corral de Mulas, agrupándose todas ellas dentro del patrón de infección del norte característico de Cpp (Figura 5.3.1). Es entre Corral de Mulas y Sallent de Gállego donde se produce el mayor cambio afectando fundamentalmente a la categoría de los coinfectados, que aumenta

drásticamente en detrimento de los individuos no infectados (Figura 5.4.1). Entre Sallent de Gállego y Escarrilla vuelven a variar las frecuencias de infección afectando esta vez fundamentalmente a la categoría de los coinfectados que disminuyen, de nuevo drásticamente, a favor de los infectados sólo por el supergrupo F. Escarrilla se agrupa ya dentro del patrón de infección del sur típico de Cpe. Sallent de Gállego, primera población en donde se detectan individuos híbridos en el transecto (por el lado sur), define un tercer patrón de infección que parece actuar como puente entre los otros dos patrones y quizás sea el resultado de su encuentro (Figura 5.3.4).

Debido a que la bacteria sigue un patrón de herencia materna, el pico de coinfección en esta población implica una fuerte selección positiva de los individuos que portan ambos supergrupos de *Wolbachia*, lo cual es esperable en un modelo de IC bidireccional (Frank, 1998). Las hembras coinfectadas dejarían más descendientes que el resto de las hembras, incrementándose la proporción de individuos coinfectados generación tras generación, hasta alcanzar el equilibrio. Sin embargo, esto sólo se cumpliría bajo unas condiciones específicas que incluyen escenarios con determinadas frecuencias de infección. Dichas condiciones no parecen darse en ninguna de las poblaciones de los patrones de infección norte y sur pero sí donde éstos confluyen.

En la zona híbrida se produce también el encuentro de cepas bacterianas con fondos genéticos nuevos proporcionados por su hospedador. Como se ha comentado anteriormente, la infección en *C. parallelus* parece ser antigua, lo que implicaría coevolución entre la bacteria y las subespecies del saltamontes (apartado [8.1](#)). Las cepas características de cada subespecie habrían interactuado con los genomas de Cpp y Cpe durante el tiempo que divergieron en alopatria. La selección habría actuado sobre dichas interacciones estabilizando la infección dentro de cada subespecie. Al originarse la zona híbrida, las cepas presentes en una subespecie entrarían en contacto con el genoma de la otra subespecie y con el de los híbridos generados. En estos nuevos ambientes, el comportamiento de la infección puede cambiar completamente (para una revisión del tema: Hughes & Rasgon, 2014). Además, el encuentro entre cepas divergentes permite la recombinación y la aparición de nuevos genomas bacterianos. Se ha comprobado la existencia de cepas bacterianas recombinantes justamente en la zona híbrida, mientras que no se han detectado fuera de la misma (Martínez-Rodríguez, 2013). Estos factores pueden también ayudar a explicar la aparición del patrón de

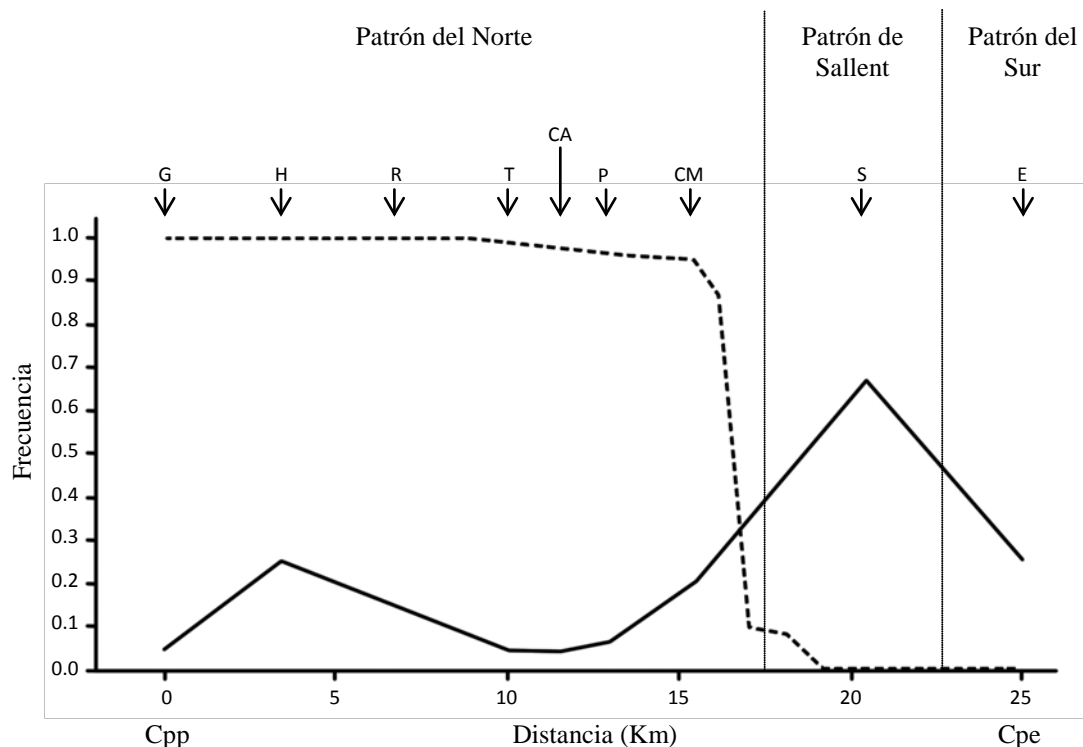


Figura 8.4.1. Coincidencia entre la clina de la banda P y el pico de coinfección. La frecuencia de la banda P y su NOR asociado (línea discontinua) decae rápidamente al cambiar el patrón de infección típico del norte al presente el Sallent de Gállego. Este último se caracteriza por presentar frecuencias muy altas de coinfección (línea continua). Las flechas indican la posición de las poblaciones estudiadas (códigos como en la figura 5.4.1).

infección encontrado en la población híbrida de Sallent de Gállego y que no comparte con ninguna otra población.

Los cambios en las frecuencias de infección no ocurren en el punto de la zona híbrida descrito para la mayoría del resto de caracteres estudiados (su centro), sino que existe un desplazamiento de varios kilómetros hacia el sur (Butlin *et al.*, 1991; Hewitt, 1993; Butlin, 1998). Comparando la distribución de la infección con las clinas de los caracteres estudiados previamente, resulta muy interesante la coincidencia entre el aumento de la coinfección y la clina de la banda P (Figura 8.4.1). Esta última clina muestra la introgresión de dicho marcador de heterocromatina constitutiva, típico de Cpp, y su NOR asociado varios kilómetros hacia el extremo Cpe respecto del centro de la zona híbrida (Ferris *et al.*, 1993; Serrano *et al.*, 1996). A ambos lados del centro de

esta clina parece haber una fuerte selección de signo contrario que genera un perfil a modo de escalón (ver Figura 8.4.1). La pregunta es si esta coincidencia es al azar, o puede existir alguna relación entre el pico de coinfección y la brusca caída de la banda P en este punto.

Virdee y Hewitt (1992), realizaron una serie de cruzamientos y retrocruzamientos posteriores entre individuos procedentes de las poblaciones de Gabas (C_{pp}) y Sallent de Gállego (C_{pe}?). En los machos resultantes de los retrocruzamientos, detectaron cómo el grado de disfunción testicular era más severo cuando el marcador del cromosoma X y su citoplasma no eran de la misma subespecie. De esta forma, propusieron interacciones entre la región de la banda P y factores citoplasmáticos. Sin embargo, no detectaron incompatibilidad entre dicha región cromosómica con los autosomas. Por otra parte, Rubio (1992) observó en otros retrocruzamientos realizados en el laboratorio una mortalidad diferencial en los embriones de los machos F₂ resultantes cuando la región de la banda P, típica de C_{pp}, se encontraba en un ambiente citoplasmático que se correspondía con la subespecie C_{pe}.

Todo apunta a que hay una fuerte incompatibilidad entre la región de la banda P, o la actividad de su NOR, y el citoplasma de C_{pe}. La coincidencia del pico de coinfección y el brusco descenso en la clina de la banda P puede tener entonces una explicación. Se ha comentado anteriormente cómo la coinfección en Sallent de Gállego parece responder a la existencia de IC bidireccional. Esto quiere decir que unas pocas hembras adquirieron la coinfección y que ésta se extendió, generación tras generación, de dichas madres a sus descendientes hasta alcanzar el equilibrio. Una vez alcanzado éste, las hembras coinfectadas son las que mantienen el polimorfismo de la infección según las tasas de transmisión vertical que presenten las distintas cepas implicadas (Frank, 1998). Pero, como dijimos en la Introducción (apartado [3.2](#)), al extenderse la coinfección, se extenderían también los factores citoplasmáticos existentes en aquellas madres. Por la localización de Sallent de Gállego, el citoplasma de dichas hembras sería el típico de C_{pe}. De esta forma, puede que en esta población se haya fijado un supuesto tipo de citoplasma presuntamente incompatible con la región cromosómica de la banda P, actuando como barrera a su introgresión.

Esta hipótesis es sensible a varios factores como la transmisión horizontal o la transmisión por vía paterna de la infección, que podrían romper el ligamiento entre la

coinfección y el citoplasma Cpe. Dichos factores se verían minimizados si el aumento de la coinfección hubiera sido muy rápida, de ahí la importancia de investigar la dinámica de infección en esta población (Figuras 7.3.1 y 7.3.2). Por otra parte, es una hipótesis contrastable mediante el análisis de la variabilidad del ADN mitocondrial a lo largo de la zona híbrida. Como también se comentó, hay evidencias de la reducción de la variabilidad en el ADN mitocondrial en poblaciones infectadas de otros organismos, debido a que comparte con la bacteria el mismo patrón de herencia materna o citoplasmática (Turelli *et al.*, 1992; Dean *et al.*, 2003; Narita *et al.*, 2006).

8.5 Efectos de *Wolbachia* sobre *C. parallelus*.

En general, podemos decir que la metodología utilizada en la realización de los cruzamientos ha sido exitosa pues las variables medidas, como el número de huevos por cruzamiento o el número de embriones por cruzamiento, están dentro del rango obtenido en estudios previos (Bella *et al.*, 1992; Reinhardt *et al.*, 1999). Así pues, los cruzamientos han podido ser caracterizados correctamente sin aparentes desviaciones provocadas por la metodología.

El fondo genético de los individuos empleados en los cruzamientos no parece tener efecto alguno sobre las variables medidas. Los cruzamientos entre individuos híbridos, procedentes de Portalet, muestran un número de huevos por cruzamiento similar al producido por los individuos puros de Gabas y Escarrilla (puros Cpp o Cpe, respectivamente). Si bien es cierto que en Portalet se obtuvo un número de puestas por cruzamiento un poco más elevado, dichas puestas contienen un menor número de huevos compensándose el número total obtenido por cruzamiento. Por tanto, la diferencia en el número de puestas no puede ser atribuida a un efecto de la heterosis y quizás se deba a adaptaciones locales. El régimen de temperatura, la duración del periodo reproductivo o la precipitación en forma de nieve de las poblaciones puras son similares entre sí, pero difieren de las de Portalet, debido a que esta última se encuentra a una mayor altitud.

Tampoco hay evidencias de una reducción en el número de embriones atribuibles al fondo genético. Ni los cruzamientos entre individuos de las poblaciones puras ni los cruzamientos entre individuos híbridos de Portalet muestran dicha

reducción. Este resultado coincide con estudios previos en los que se han realizado cruzamientos similares (Hewitt *et al.*, 1987a; Bella *et al.*, 1990; Virdee & Hewitt, 1992; Shuker *et al.*, 2005). Los problemas de los cruzamientos entre individuos de distinta subespecie ocurren en los machos híbridos F1 adultos. Dichos machos presentan disfunción testicular y anomalías meióticas asociadas, que afectarán a la siguiente generación pero nunca a la producción obtenida en la F1. Por otra parte, nunca se ha encontrado disfunción testicular en híbridos naturales, por lo que no es esperable que los individuos de Portalet estuvieran afectados. Hasta el momento, no se habían detectado problemas en la viabilidad de las descendencias obtenidas en cruzamientos entre individuos de distintas subespecies. En los resultados obtenidos en el presente trabajo, tampoco se observan dichos problemas hasta que no se analizan los cruzamientos considerando la infección como factor.

Wolbachia no parece tener ningún efecto claro sobre la eficacia biológica de las hembras. La fecundidad de las hembras infectadas no se ve reducida en ningún caso. Por el contrario, se observa un aumento en la fecundidad de las hembras portadoras del supergrupo F (tanto infectadas F como coinfectadas) como se refleja en las distribuciones posteriores obtenidas (Figura 7.1.2). Según la teoría, la selección favorecería a aquellas cepas que incrementen la producción de descendientes infectados a partir de madres portadoras (Turelli, 1994; Vautrin *et al.*, 2007). En algunos estudios se ha comprobado en poblaciones naturales la evolución desde una asociación parasítica entre *Wolbachia* y *Drosophila* hacia el mutualismo en apenas dos décadas (Weeks *et al.*, 2007). Como se ha comentado anteriormente, la presencia de *Wolbachia* en *C. parallelus* parece ser bastante antigua. Es probable que haya habido suficiente tiempo para que cualquier efecto negativo provocado por la bacteria sobre las hembras haya sido eliminado. Recientemente se ha propuesto que *Wolbachia* induce un aumento en la tasa de entrecruzamiento observada en *C. parallelus* (Sarasa *et al.*, 2013), lo que podría suponer otro efecto beneficioso de la infección. Por el contrario, en este mismo estudio se pone de manifiesto el incremento en espermátidas aberrantes en los machos infectados (un efecto que se ve incrementado en los híbridos).

Por otra parte, algunos autores se están cuestionando el papel de *Wolbachia* como parásito (para una revisión del tema: Zug & Hammerstein, 2015). La visión convencional de la bacteria es que, debido a las alteraciones reproductivas que provoca, tiene un estilo de vida parasitario en artrópodos. Sin embargo, cada vez hay más

evidencias de aportaciones beneficiosas de la bacteria que incluyen el aumento de la fecundidad y la longevidad, aporte nutricional y protección frente a patógenos. Las evidencias disponibles no excluyen que una misma cepa se comporte como mutualista a la vez que induzca alteraciones reproductivas en el mismo hospedador.

Existe una evidencia clara de que *Wolbachia* está induciendo IC en la población híbrida estudiada. En estudios recientes se ha comprobado que es poco probable que dicha IC sea producida por otros endosimbiontes como *Spiroplasma* o *Cardinium* (Martínez-Rodríguez *et al.*, 2013). La IC unidireccional está bien respaldada estadísticamente cuando es inducida por el supergrupo B, pero no ocurre lo mismo para el supergrupo F a pesar de que muestran valores promedios similares en la proporción de embriones producidos (0,517 y 0,589 embriones/huevo, respectivamente). Este resultado puede deberse a la gran varianza existente entre los cruzamientos unidireccionales donde el supergrupo F está implicado. Una prueba de ello es que, cuando se infiere la distribución posterior para la proporción de embriones (Figura 7.1.3) y su intervalo de credibilidad (Tabla 7.1.3), resultan significativamente diferentes respecto de los cruzamientos compatibles. La inferencia bayesiana de estas variables se basa en la distribución beta, que no tiene en cuenta la variación entre cruzamientos, sino la proporción total de embriones y huevos hueros encontrados en el tipo de cruzamiento. La variabilidad descrita en el supergrupo F puede provocar una gran varianza en las variables medidas. En este supergrupo se han descrito hasta cuatro cepas diferentes basadas en la variabilidad encontrada en el gen *16S rRNA* (apartado [5.1](#)). Estudios llevados a cabo en *Nasonia* han puesto de manifiesto la existencia de interacciones entre los genotipos del insecto y de la bacteria, describiéndose diferentes niveles de IC dependientes de las distintas cepas (Bordestein *et al.*, 2003). La teoría predice que la selección actuará sobre el genoma del hospedador reduciendo los niveles de IC (Turelli, 1994). Diferentes resultados de tal selección, o diferentes tiempos en los que la selección haya podido actuar, podrían explicar las diferencias encontradas entre las distintas cepas de los supergrupos B y F. Por tanto, resulta necesario realizar un estudio más amplio sobre las diferencias que puedan existir entre dichas cepas.

Wolbachia también parece inducir IC bidireccional, aunque la reducción en la producción de embriones es menor que la encontrada en los cruzamientos unidireccionales. El respaldo estadístico es robusto cuando se analizan los cruzamientos entre individuos puros, o cuando todos los cruzamientos son agrupados. Sin embargo,

no ocurre lo mismo al analizar los cruzamientos entre individuos híbridos por separado. De nuevo, la distribución posterior de la producción de embriones (Figura 7.1.3) y su intervalo de credibilidad (Tabla 7.1.3), sí muestran diferencias significativas respecto a los cruzamientos compatibles. Ahora debemos sumar a la varianza provocada por las diferentes cepas del supergrupo F ($B \times F_1$, $B \times F_2$, $B \times F_3$, $B \times F_4$), la varianza atribuible a los distintos tipos de cruzamiento bidireccionales ($B \times F$, $F \times B$, $B \times BF$ y $F \times BF$). Para analizar todas las combinaciones posibles se necesitaría un número muy superior de cruzamientos a los realizados en la actualidad. Pero hay que recordar que son experimentos realizados en condiciones cercanas a las de la naturaleza, y con individuos recolectados y mantenidos en el campo. No es el tipo de organismo ni el modelo que permite hacer estos experimentos en el laboratorio y a gran escala. De hecho son escasos los ejemplos comparables en la literatura.

Los niveles de IC inducida *Wolbachia* detectados en poblaciones naturales suelen ser más bajos que los detectados en cruzamientos realizados en laboratorio (Hoffmann *et al.*, 1998). Estas diferencias suelen asociarse a eventos ocurridos durante la diapausa (Perrot-Minnot *et al.*, 1996), altas temperaturas (Stevens, 1989), antibióticos naturales (Stevens & Wicklow, 1992) o la edad de los machos (Hoffmann *et al.*, 1996; Bressac & Rousset, 1993). Además, aunque se ha propuesto que la mayor parte de la mortalidad ocurre durante las primeras etapas embrionarias (Bordenstein *et al.*, 2003; Serbus *et al.*, 2008), es posible que hubiéramos detectado una mayor mortalidad en los cruzamientos incompatibles al estudiar las descendencias después de la eclosión o en su estado adulto. No obstante, los niveles de IC detectados no son nada despreciables y pueden tener una gran influencia en la dinámica de la zona híbrida.

8.6 Dinámica de la infección en *C. parallelus*.

Ambos supergrupos muestran niveles de IC suficientemente altos como para extender y mantener la infección en una población. Para ello, se necesitan valores de transmisión vertical bastante elevados, pero siempre dentro del intervalo que descarta la necesidad de aportaciones externas mediante transmisión horizontal o migración (valores entre 0 y 1). En muchos estudios realizados en poblaciones naturales de distintas especies, se han observado valores cercanos a la transmisión vertical perfecta

(Hoffmann *et al.*, 1996; Rasgon & Scott, 2003; Charlat *et al.*, 2004; Sinkins, 2004; Narita *et al.*, 2007).

Si se introduce incertidumbre en la variable fecundidad, los valores de transmisión vertical requeridos (Tabla 7.2.1. Distribuciones de los parámetros estimados en el equilibrio), y los umbrales de infección mínima necesarios para que *Wolbachia* se establezca en la población, disminuyen considerablemente. Sin embargo, la probabilidad de alcanzar el equilibrio de frecuencias observado en Sallent de Gállego también se reduce, aunque sigue siendo alta. De nuevo, discernir cuál es el efecto de las cepas del supergrupo F de *Wolbachia* sobre la fecundidad de las hembras es de vital importancia a la hora de entender la dinámica de la infección en *C. parallelus*.

En cualquiera de los escenarios analizados (Figuras 7.3.1 y 7.3.2), se observan momentos de muy rápida expansión de la infección (en inglés, *sweeps*) que podrían haber inducido una fuerte estructura genética poblacional. El escenario más adverso para la aparición de dicha estructura se daría en una situación en la que una población infectada por el supergrupo B fuera superinfectada por el supergrupo F, sin que este último tuviera efecto alguno sobre la fecundidad de las hembras (Figura 7.3.1c). En este caso, se necesitarían valores bastante altos de transmisión horizontal pues el umbral de individuos coinfectados se sitúa en el 26,9 %. Cuanto mayor sea la tasa de transmisión horizontal, es menos probable el efecto de barrido sobre la variabilidad citoplasmática que el aumento repentino de la infección puede provocar en la población. En el resto de escenarios los umbrales mínimos de infección son mucho más bajos, especialmente si el supergrupo F aumenta la fecundidad de las hembras a las que infecta.

El estudio de la dinámica de la infección nos sirve para comprobar que *Wolbachia* puede mantenerse en la población mediante las alteraciones que produce en *C. parallelus*, así como para verificar el efecto de barrido que podría haber tenido en una población y los umbrales mínimos de infección requeridos para llegar a los distintos equilibrios. Sin embargo, no es posible una visión reduccionista que ignore las interacciones entre bacteria y hospedador, el tiempo transcurrido desde el origen de la infección, la acción de la selección sobre dichas interacciones durante ese tiempo, la diversidad de cepas bacterianas o la situación de partida.

Como se ha comentado anteriormente, la coevolución entre determinadas cepas y el genoma de una subespecie puede provocar que el comportamiento de la infección sea diferente en poblaciones puras o en poblaciones de la zona híbrida. La recombinación entre distintas cepas bacterianas, posibilitada por la formación de la zona híbrida, puede influir también en la dinámica de la infección. Si la infección, como parece ser, es previa a la formación de la zona híbrida, los escenarios de partida pudieron ser muy diferentes a los planteados en las simulaciones realizadas en el presente trabajo. Es evidente que algo parecido debe de estar ocurriendo dada la estabilidad observada en las frecuencias de infección tanto en las poblaciones estudiadas en años sucesivos como dentro de los patrones de infección descritos. Por tanto, las características propias de cada población deben ser tenidas en cuenta, y las conclusiones de las simulaciones tomadas con cautela.

CONCLUSIONES

1. *Chorthippus parallelus* presenta infección por *Wolbachia*, detectándose cepas bacterianas pertenecientes a los supergrupos B y F. La diversidad existente en la infección puede explicarse, en parte, mediante procesos de codivergencia con el saltamontes. Esta circunstancia apunta a que la presencia de la bacteria es anterior a la formación de la zona híbrida.
2. Ambos supergrupos bacterianos están presentes en la mayoría de las poblaciones, pudiendo infectar a la vez a un mismo individuo. La probabilidad de presentar infección es independiente del sexo, descartándose de entre las alteraciones inducidas por *Wolbachia* la feminización, la muerte selectiva de machos y la partenogénesis.
3. *Chorthippus parallelus parallelus* y *Chorthippus parallelus erythropus* muestran frecuencias de infección claramente diferentes. *Chorthippus parallelus parallelus* se caracteriza por presentar frecuencias de infección bajas, mientras que *Chorthippus parallelus erythropus* presenta una alta incidencia del supergrupo F.
4. Ambos supergrupos bacterianos definen dos patrones biogeográficos de infección, el del norte y el del sur, que confluyen en el transecto estudiado de la zona híbrida y propician la aparición de un tercer patrón en la población híbrida de Sallent de Gállego. Este tercer patrón se caracteriza por presentar frecuencias de coinfección extremadamente altas.
5. Las variaciones de las frecuencias de infección a lo largo del tiempo estudiado se muestran oscilantes, sin dibujar una tendencia clara. Parecen pivotar en torno a un equilibrio sostenido en el tiempo. Esta situación, junto a la relativa homogeneidad encontrada entre algunas de las poblaciones y que permite definir los patrones de infección, apunta a la existencia de una infección estable dentro de cada uno de dichos patrones biogeográficos.
6. *Wolbachia* no supone un coste para las hembras infectadas o, en todo caso, las cepas del supergrupo F pueden estar aumentando la fecundidad de éstas. Se han detectado niveles apreciables de incompatibilidad citoplasmática inducida por

Wolbachia, tanto unidireccional como bidireccional. Sin embargo, la incompatibilidad no es total, permitiendo que una proporción de los descendientes en los cruzamientos afectados, sea viable. Dicha proporción es mayor en los cruzamientos compatibles bidireccionales.

7. Las alteraciones reproductivas detectadas permiten a la bacteria extenderse y mantenerse en una población sin necesidad de aportes externos como la transferencia horizontal o la migración. Para ello, requiere tasas de transmisión vertical casi perfectas, algo que en nuestro caso no podemos confirmar.
8. La dinámica de la infección muestra también su capacidad para aumentar rápidamente en una población, barriendo potencialmente la variabilidad existente de los factores citoplasmáticos. Un escenario así es compatible con la situación descrita en la población de Sallent de Gállego en la zona híbrida en Pirineos.
9. La distribución de la infección y las alteraciones reproductivas que produce la bacteria en la zona híbrida de *Chorthippus parallelus* podrían explicar las asimetrías detectadas en estudios previos, como la homogamia asimétrica o la mayor direccionalidad en la elección de pareja de ciertas hembras en poblaciones cercanas al centro de la zona híbrida.
10. Por todo lo expuesto anteriormente, *Wolbachia* puede estar influyendo en el sentido del flujo génico entre *Chorthippus parallelus parallelus* y *Chorthippus parallelus erythropus*. También puede haber provocado la fijación de factores citoplasmáticos, generando una barrera que impide el avance de aquellos caracteres incompatibles con dichos factores. Si bien no es causa directa de especiación en *Chorthippus parallelus*, tiene la capacidad de influir significativamente en la dinámica de la zona híbrida.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbott R, Albach D, Ansell S, Arntzen JW, Baird SJE, Bierne N, Boughman J, Brelsford A, Buerkle CA, Buggs R, Butlin RK, Dieckmann U, Eroukhmanoff F, Grill A, Cahan SH, Hermansen JS, Hewitt G, Hudson AG, Jiggins C, Jones J, Keller B, Marczewski T, Mallet J, Martinez-Rodriguez P, Möst M, Mullen S, Nichols R, Nolte AW, Parisod C, Pfennig K, Rice AM, Ritchie MG, Seifert B, Smadja CM, Stelkens R, Szymura JM, Väinölä R, Wolf JBW, Zinner D (2013). Hybridization and speciation. *Journal of Evolutionary Biology*, 26: 229-246.
- Ahmed MZ, Li SJ, Xue X, Yin XJ, Ren SX, Jiggins FM, Greeff JM, Qiu BL (2015). The intracellular bacterium *Wolbachia* uses parasitoid wasps as phoretic vectors for efficient horizontal transmission. *PLoS Pathogens*, 10(2): e1004672.
- Alley RB (2004). GISP2 Ice Core Temperature and Accumulation Data. <https://www.ncdc.noaa.gov/paleo/study/2475>.
- Andersen BG & Borns HW (1994). The ice age world: an introduction to Quaternary history and research with emphasis on North America and northern Europe during the last 2.5 million years Oslo: Scandinavian University Press.
- Arnold ML (1992). Natural hybridization as an evolutionary process. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 23: 237-261.
- Atyame CM, Labbé P, Rousset F, Beji M, Makoundou P, Duron O, Dumas E, Pasteur N, Bouattour A, Fort P, Weill M (2015). Stable coexistence of incompatible *Wolbachia* along a narrow contact zone in mosquito field populations. *Mol. Ecol.* 24(2): 508-521.
- Baldo L, Dunning Hotopp JC, Jolley KA, Bordenstein SR, Biber SA, Choudhury RR, Hayashi C, Maiden MCJ, Tettelin H & Werren JH (2006). Multilocus sequence typing system for the endosymbiont *Wolbachia pipientis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 7098-7110.
- Bank C, Hermisson J, Kirkpatrick M (2012) Can reinforcement complete speciation? *Evolution*, 66(1): 229-239.

- Barton NH (1979). The dynamics of hybrid zones. *Heredity*, 43: 341-359.
- Barton NH (2001). The role of hybridization in evolution. *Molecular Ecology*, 1: 551-568.
- Barton NH & Hewitt GM (1981). The genetic basis of hybrid inviability between two chromosomal races of the grasshopper *Podisma pedestris*. *Heredity*, 47: 367-383.
- Barton NH & Hewitt GM (1985). Analysis of hybrid zones. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 16: 113-148.
- Bateson W (1909). Heredity and variation in modern lights. En: Seward AC (ed.) Darwin and Modern Science. Cambridge University Press, Cambridge, UK. Pp. 85-101.
- Bella JL, Hewitt GM, Gosálvez J (1990). Meiotic imbalance in laboratory produced hybrid males of *Chorthippus parallelus parallelus* and *Chorthippus parallelus erythropus*. *Genet. Res.* 56: 43-48.
- Bella J., Butlin RK, Ferris C, Hewitt GM (1992). Asymmetrical homogamy and unequal sex ratio from reciprocal mating order crosses between *Chorthippus parallelus* subspecies. *Heredity* 68: 345-352.
- Bella JL, Serrano L, Hewitt GM, Gosálvez, J (1993). Heterochromatin heterogeneity and rapid divergence of the sex-chromosomes in *Chorthippus parallelus parallelus* and *C. p. erythropus* (Orthoptera). *Genome*, 36: 542-547.
- Bella JL, Serrano L, Orellana J, Mason PL (2007). The origin of the *Chorthippus parallelus* hybrid zone: chromosomal evidence of multiple refugia for Iberian populations. *Journal of Evolutionary Biology*, 20: 568-576.
- Bella JL, Martínez-Rodríguez P, Arroyo-Yebras F, Bernal A, Sarasa J, Fernández-Calvín B, Mason PL, Zabal-Aguirre M (2010). *Wolbachia* infection in the *Chorthippus parallelus* hybrid zone: evidence for its role as a reproductive barrier. *Journal of Orthoptera Research*, 19: 205-212.

- Benton MJ & Pearson PN (2001). Speciation in the fossil record. *Trends Ecol. Evol.*, 16: 405-411.
- Bodilis J, Calbrix R, Guerillon J, Merieau A, Pawlak B, Orange N, Barray S (2004). Phylogenetic relationships between environmental and clinical isolates of *Pseudomonas fluorescens* and related species deduced from *16S rRNA* gene and *OprF* protein sequences. *System. Appl. Microbiol.*, 27: 93-108.
- Bordenstein SR, O'Hara FP, Werren JH (2001). *Wolbachia*-induced incompatibility precedes other hybrid incompatibilities in *Nasonia*. *Nature* 409: 707-710.
- Bordenstein SR, Uy JJ, Werren JH (2003). Host genotype determines cytoplasmic incompatibility type in the haplodiploid genus *Nasonia*. *Genetics*, 164: 223-233.
- Bordenstein SR, Paraskevopoulos C, Dunning Hotopp JCD, Sapountzis P, Lo N, Bandi, C, Tettelin H, Werren JH & Bourtzis K (2009). Parasitism and mutualism in *Wolbachia*: what the phylogenomic trees can and cannot say. *Molecular Biology and Evolution*, 26: 231-241.
- Bossan, B, Koehncke A, Hammerstein P (2011). A new model and method for understanding *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility. *Plos One*, 6: e19757.
- Bressac C & Rousset F (1993). The reproductive incompatibility system in *Drosophila simulans*: DAPI-staining analysis of the *Wolbachia* symbionts in sperm cysts. *J. Invertebr. Pathol.* 61: 226-230.
- Brucker RM & Bordenstein SR (2012). Speciation by simbiosis. *Trends in Ecology and Evolution*, 27 (8): 443-451.
- Buerkle CA, Morris RJ, Asmussen MA, Rieseberg LH (2000). The likelihood of homoploid hybrid speciation. *Heredity*, 84: 441-451.
- Buño I, Torroja E, López-Fernández C, Butlin RK, Hewitt GM, Gosálvez J (1994). A hybrid zone between two subspecies of the grasshopper *Chorthippus parallelus* along the Pyrenees: the west end. *Heredity*, 73: 625-634.
- Butlin RK (1987). Speciation by reinforcement. *Trends Ecol. Evol.*, 2: 8-13.

- Butlin RK (1995). Reinforcement: an idea evolving. *Trends Ecol. Evol.*, 10: 432-434.
- Butlin RK (1998). What do hybrid zones in general, and the *Chorthippus parallelus* zone in particular, tell us about speciation? In: *Endless Forms: Species and Speciation* (eds Howard DJ, Berlocher SH). Oxford University Press, New York. Pp. 367-378.
- Butlin RK & Hewitt GM (1985a). A hybrid zone between *Chorthippus parallelus parallelus* and *Chorthippus parallelus erythropus* (Orthoptera: Acrididae): morphological and electrophoretic characters. *Biol. J. Linn. Soc.*, 26: 269-285.
- Butlin RK & Hewitt GM (1985b). A hybrid zone between *Chorthippus parallelus parallelus* and *Chorthippus parallelus erythropus* (Orthoptera: Acrididae): Behavioural characters. *Biol. J. Linn. Soc.*, 26: 287-299.
- Butlin RK & Ritchie MG (1991). Variation in female mate preference across a grasshopper hybrid zone. *Journal of Evolutionary Biology*, 4: 227-240.
- Butlin RK, Ritchie MG, Hewitt GM (1991). Comparisons among morphological characters and between localities in the *Chorthippus parallelus* hybrid zone (Orthoptera: Acrididae). *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, 334: 297-308.
- Butlin RK, Saura M, Charrier G, Jackson B, André C, Caballero A, Coyne JA, Galindo J, Grahame JW, Hollander J, Kemppainen P, Martínez-Fernández M, Panova, M, Quesada H, Johannesson K, Rolán-Alvarez E (2014). Parallel evolution of local adaptation and reproductive isolation in the face of gene flow. *Evolution*, 68: 935-949.
- Casiraghi M, Bordenstein SR, Baldo L, Lo N, Beninati T, Wernegreen JJ, Werren JH, Bandi C (2005). Phylogeny of *Wolbachia pipientis* based on *gltA*, *groEL* and *ftsZ* gene sequences: clustering of arthropod and nematode symbionts in the F supergroup, and evidence for further diversity in the *Wolbachia* tree. *Microbiology*, 151: 4015-4022.
- Caspari E & Watson GS (1959). On the evolutionary importance of cytoplasmic sterility in mosquitoes. *Evolution*, 13: 568-570.

- Charlat S, Ballard JW, Merçot H (2004). What maintains noncytoplasmic incompatibility inducing *Wolbachia* in their hosts: a case study from a natural *Drosophila yakuba* population. *J. Evol. Biol.*, 17: 322-330.
- Charlesworth B, Coyne JA, Barton NH (1987). The relative rates of evolution of sex chromosomes and autosomes. *Am. Nat.*, 130: 113-146.
- Chen XP, Dong YJ, Guo WP, Wang W, Li MH, Xu J, Dumler JS, Zhang YZ (2015). Detection of *Wolbachia* genes in a patient with non-Hodgkin's lymphoma. *Clinical Microbiology and Infection*, 21(2): 182.e1-182.e4.
- Claridge MF (2010) Species are real biological entities. In: Ayala FJ, Arp R (eds.) Contemporary debates in philosophy of biology. Chichester, Wiley-Blackwell, pp 91-109.
- Cooper SJB & Hewitt GM. (1993). Nuclear DNA sequence divergence between parapatric subspecies of the grasshopper *Chorthippus parallelus*. *Insect Molecular Biology*, 2: 1-10.
- Cooper SJB, Ibrahim KM, Hewitt GM (1995). Post-glacial expansion and genome subdivision in the European grasshopper *Chorthippus parallelus*. *Molecular Ecology*, 4: 49-60.
- Coyne JA & Orr HA (1997). "Patterns of speciation in *Drosophila*" revisited. *Evolution*, 51: 295-303.
- Coyne JA & Orr HA (2004). Speciation. Sinauer Associates, Sunderland, MA, USA.
- Darwin C (1859). On the origin of species by means of natural selection or the preservation of favored races in the struggle for life. J. Murray, London. Pp. 52 y 485.
- Dean MD, Ballard KJ, Glass A, Ballard JWO (2003). Influence of two *Wolbachia* strains on population structure of East African *Drosophila simulans*. *Genetics*, 165: 1959-1969.
- De Queiroz K (1998). The general lineage concept of species, species criteria, and the process of speciation: A conceptual unification and terminological

- recommendations. Pages 57-75 in *Endless forms: Species and speciation* (D. J. Howard, and S. H. Berlocher, eds.). Oxford University Press, New York.
- De Queiroz K (2007). Species concepts and species delimitation. *Syst Biol*, 56:866-879.
- Dillon RJ, Webster G, Weightman AJ, Dillon VM, Blanford S, Charnley AK (2008). Composition of Acridid gut bacterial communities as revealed by *16S rRNA* gene analysis. *Journal of Invertebrate Pathology*, 97: 265-272
- Dobzhansky T (1934). Studies on hybrid sterility. I. Spermatogenesis in pure and hybrid *Drosophila pseudobscura*. *Z. Zellforsch. Microsk. Anat.*, 21: 169-221.
- Dobzhansky T (1937). *Genetics and the origin of species*. Columbia University Press, New York.
- Drummond AJ, Suchard MA, Xie D, Rambaut A (2012) Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7 *Molecular Biology And Evolution*, 29: 1969-1973.
- Endler JA (1977). *Geographic variation, speciation and clines*. Princeton: Princeton University Press.
- Endler A (1982). Problems in distinguishing historical from ecological factors in biogeography. *American Zoologist*, 22: 441-452.
- EPICA community members (2004). Eight glacial cycles from an Antarctic ice core. *Nature*, 429: 623-628.
- Ereshefsky M (2010). Microbiology and the species problem. *Biology & Philosophy*, 25(4): 553-568.
- Excoffier L & Lischer HEL (2010). Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 10: 564-567.
- Faber A (1958). *Chorthippus erythropus* n. sp., ein nachster Verwandter der Gemeinen Grasschrecke (*Ch. longicornis* Latv.). *Stuttgarter Beitrage zur Naturkunde*, 16: 1-8.

- Fenn K & Blaxter M (2006). *Wolbachia* genomes: revealing the biology of parasitism and mutualism. *Trends Parasitol.*, 22: 60-65.
- Ferris C, Rubio JM, Serrano L, Gosálvez J, Hewitt GM (1993). One way introgression of a subspecific sex chromosome marker in a hybrid zone. *Heredity*, 71: 119-129.
- Flanagan NS, Mason PL, Gosálvez J, Hewitt GM (1999). Chromosomal differentiation through an Alpine hybrid zone in the grasshopper *Chorthippus parallelus*. *Journal of Evolutionary Biology*, 12: 577-585.
- Frank SA (1998). Dynamics of cytoplasmic incompatibility with multiple *Wolbachia* infections. *J. Theor. Biol.* 192: 213-218.
- Funkhouser-Jones LJ, Martínez-Rodríguez P, Toribio R, Pita M, Bella JL, Bordenstein SR (2015). Hologenomic evolution in a Pyrenean hybrid zone: bacteriophage WO diversity and extensive lateral transfers from multiple *Wolbachia* supergroups to a grasshopper genome. *mBio* (pendiente de publicación).
- Galindo J, Martínez-Fernández M, Rodríguez-Ramilo ST, Rolán-Alvarez E. (2013). The role of local ecology during hybridization at the initial stages of ecological speciation in a marine snail. *Journal of Evolutionary Biology*, 26(7): 1472-1487.
- Giordano R, O'Neill SL, Robertson HM (1995). *Wolbachia* infections and the expression of cytoplasmic incompatibility in *Drosophila sechellia* and *D. Mauritania*. *Genetics* 140: 1307-1317.
- Glaeser SP & Kämpfer, P. (2015). Multilocus sequence analysis (MLSA) in prokaryotic taxonomy. *Systematic and Applied Microbiology*, 38(4): 237-245.
- Gosálvez J, López-Fernández C, Bella JL, Butlin RK, Hewitt GM (1988). A hybrid zone between *Chorthippus parallelus parallelus* and *Chorthippus parallelus erythropus* (Orthoptera: Acrididae): chromosomal differentiation. *Genome*, 30: 656-663.
- Gravilets S (2014). Models of Speciation: Where Are We Now? *Journal of Heredity*, 105(Special Issue): 743-755.

- Hadid Y, Pavlíček T, Beiles A, Ianovici R, Raz S, Nevo E (2014). Sympatric incipient speciation of spiny mice *Acomys* at “Evolution Canyon,” Israel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 111: 1043-1048.
- Haldane JBS (1922). Sex ratio and unisexual sterility in animal hybrids. *Journal of Genetics*, 12: 101-109.
- Haldane JBS (1948). The theory of a cline. *J. Genetics*, 48: 277-284.
- Hall TA (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.*, 41: 95-98.
- Harrison, R.G. 1990. Hybrid zones and the evolutionary process. En: *Oxford surveys in Evolutionary Biology*, Vol. 7. D. Futuyma & J. Antonovics, eds. Oxford University press.
- Harrison RG & Rand DM (1989). Mosaic hybrid zones and the nature of the species boundaries. En: *Speciation and its consequences*. Ed. Harrison R.G., pp: 3-12. Oxford University Press. Oxford, New York.
- Hasegawa M, Kishino H, Yano T (1985). Dating of human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution*, 22: 160-174.
- Hertig M & Wolbach SB (1924). Studies on rickettsia-like microorganism in insect. *J. Med. Res.* 44: 329-374
- Hewitt GM (1988). Hybrid zones: natural laboratories for evolutionary studies. *Trends Ecol. Evol.*, 3: 158-167.
- Hewitt GM (1993). After the ice: *parallelus* meets *erythropus* in the Pyrenees. In: Hybrid Zones and the Evolutionary Process (R. G. Harrison, ed.), pp. 140-164. Oxford University Press, Oxford.
- Hewitt GM (1996). Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biological Journal of the Linnean Society*, 58:247-276.
- Hewitt GM (1999). Post-glacial re-colonization of European biota. *Biological Journal of the Linnean Society*, 68: 87-112.

- Hewitt GM (2000). The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature*, 405:907-913.
- Hewitt GM (2001). Speciation, hybrid zones and phylogeography— or seeing genes in space and time. *Mol Ecol*, 10:537-549.
- Hewitt GM (2011). Quaternary phylogeography: the roots of hybrid zones. *Genetica*, 139: 617-638.
- Hewitt GM, Butlin RK, East TM (1987a). Testicular dysfunction in hybrids between parapatric subspecies of the grasshopper *Chorthippus parallelus*. *Biological Journal of the Linnean Society*, 31: 25-34.
- Hewitt GM, Nichols RA, Barton NH (1987b). Homogamy in a hybrid zone in the alpine grasshopper *Podisma pedestris*. *Heredity*, 59: 457-466.
- Hey J (2001). The mind of the species problem. *Trends in Ecology & Evolution*, 16(7): 326-329.
- Hey J (2006). On the failure of modern species concepts. *Trends in Ecology and Evolution*, 21: 447-450.
- Hilgenboecker K, Hammerstein P, Schlattmann P, Telschow A, Werren JH (2008). How many species are infected with *Wolbachia*? A statistical analysis of current data. *F.E.M.S. Microbiol. Lett.*, 281: 215-220.
- Hochkirch A (2013). Hybridization and the origin of species. *J . Evol. Biol.* 26: 247-251.
- Hoffmann AA, Clancy D, Duncan J (1996). Naturally-occurring *Wolbachia* infection in *Drosophila simulans* that does not cause cytoplasmic incompatibility. *Heredity* 76(Pt 1): 1-8.
- Hoffmann, AA, Hercus M, Dagher H (1998). Population dynamics of the *Wolbachia* infection causing cytoplasmic incompatibility in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 148: 221-231.

- Hughes GL & Rasgon JL (2014). Transinfection: a method to investigate *Wolbachia*-host interactions and control arthropod-borne disease. *Insect Mol Biol.* 23(2):141-151.
- Hurst GDD & Werren JH (2001). The role of selfish genetic elements in eukaryotic evolution. *Nat. Rev. Genet.*, 2: 597-606.
- Huxley JS (1938). Clines: an auxiliary taxonomic principle. *Nature*, 142: 219-220.
- Iturbe-Ormaetxe I & O'Neill SL (2007). *Wolbachia*-host interactions: connecting phenotype to genotype. *Current opinion in microbiology*, 10(3): 221-224.
- Jeyaprakash A & Hoy MA (2000). Long PCR improves *Wolbachia* DNA amplification: wsp sequences found in 76% of sixty-three arthropod species. *Insect Mol. Biol.*, 9: 393-405.
- Jiggins FM, Hurst GDD (2011). Rapid insect evolution by symbiont transfer. *Science*, 332: 185-186.
- Johannesson K, Panova M, Kemppainen P, André C, Rolán-Alvarez E, Butlin RK (2010). Repeated evolution of reproductive isolation in a marine snail: unveiling mechanisms of speciation. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 365: 1735-1747.
- John B & Hewitt GM (1966). A polymorphism for heterochromatic supernumerary segments in *Chorthippus parallelus*. *Chromosoma*, 18: 254-271.
- Kelly-Stebbins AP & Hewitt GM (1972). The laboratory breeding of British Gomphocerine grasshoppers (Orthoptera: Acrididae). *Acrida* 1: 233-245.
- Knowlton N, Weigt LA, Solorzano LA, Mills DK, Bermingham E (1993). Divergence in proteins, mitochondrial DNA, and reproductive compatibility across the Isthmus of Panama. *Science*, 260(5114): 1629-1632.
- Korkmaz EM, Lunt DH, Çıplak B, Değerli N, Başbüyük HH (2014). The contribution of Anatolia to European phylogeography: the centre of origin of the meadow grasshopper, *Chorthippus parallelus*. *Journal of Biogeography*, 41(9): 1793-1805.

- Kremer N & Huigens ME (2011). Vertical and horizontal transmission drive bacterial invasion. *Molecular Ecology*, 20: 3496-3498.
- Kuo CH & Ochman H (2009). Inferring clocks when lacking rocks: the variable rates of molecular evolution in bacteria. *Biology Direct*, 4: 35.
- Lassy CW & Karr TL (1996). Cytological analysis of fertilization and early embryonic development in incompatible crosses of *Drosophila simulans*. *Mech. Dev.*, 57: 47-58.
- LePage D & Bordenstein SR (2013). *Wolbachia*: Can we save lives with a great pandemic?. *Trends in Parasitology*, 29(8), 385-393.
- Lo N, Casiraghi M, Salati E, Bazzochi C, Bandi C (2002). How many *Wolbachia* supergroups exist? *Mol Biol Evol*, 19: 341-346.
- Lo N, Paraskevopoulos C, Bourtzis K, O'Neill SL, Werren JH, Bordenstein SR, Bandi C (2007). Taxonomic status of the intracellular bacterium *Wolbachia pipientis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57: 654-657.
- Lunn D, Spiegelhalter D, Thomas A, Best N (2009). The BUGS project: evolution, critique, and future directions. *Stat. Med.*, 28: 3049-3067.
- Lunt DH, Ibrahim KM, Hewitt GM (1998). MtDNA phylogeography and post-glacial patterns of subdivision in the meadow grasshopper *Chorthippus parallelus*. *Heredity*, 80: 63-641.
- Mallet J (1986). Hybrid zones of *Heliconius* butterflies in Panamá and the stability and movement of warning colour clines. *Heredity*, 56: 191-202.
- Mallet J (2005). Hybridization as an invasion of the genome. *Trends in Ecology and Evolution*, 20(5): 229-237.
- Martínez P, Del Castillo P, Bella JL (2009). Cytological detection of *Wolbachia* in squashed and paraffin embedded insect tissues. *Biotechnic & Histochemistry*, 84(6), 347-353.

- Martínez-Rodríguez P (2013). Divergencia inducida por *Wolbachia* en la zona híbrida de *Chorthippus parallelus* (Orthoptera). Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Madrid. Madrid, España.
- Martínez-Rodríguez P, Hernández-Pérez M, Bella JL (2013). Detection of *Spiroplasma* and *Wolbachia* in the bacterial gonad community of *Chorthippus parallelus*. *Microb. Ecol.*, 66: 211-223.
- Martínez-Rodríguez P, Granero-Belinchón R, Arroyo-Yebras F, Bella JL (2014). New insight into *Wolbachia* epidemiology: its varying incidence during the host life cycle can alter bacteria spread. *Bulletin of Mathematical Biology*, 76(10): 2646-2663.
- Mayden RL (1997). A hierarchy of species concepts: the denouement in the saga of the species problem. In *Species: the units of biodiversity* (Claridge, MF et al., eds.), pp. 381-424, Chapman & Hall.
- Mayr E (1942). *Systematics and the Origin of Species: From the Viewpoint of a Zoologist*. Columbia University Press, New York, USA.
- Mayr E (1957). Species concepts and definitions, In: *The Species Problem* (Mayr, E., ed.), pp. 1-22, American Association for the Advancement of Science.
- Mayr E (1963). *Animal species and evolution*. Belknap Press Cambridge, MA.
- Mayr E (1982). *The Growth of Biological Thought*. Harvard University Press. Cambridge, MA.
- Mayr E (1992). A local flora and the biological species concept. *Am. J. Bot.*, 79: 222-238.
- Menna P, Hungria M, Barcellos FG, Bangel EV, Hess PN, Martinez-Romero E (2006). Molecular phylogeny based on the *16S rRNA* gene of elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants. *Syst. Appl. Microbiol.*, 29:315-332.
- Mercot H & Poinot D (2009). Infection by *Wolbachia*: from passengers to residents. *Comptes Rendus Biologies*, 332: 284-297.

- Mishler B (2010). Species are not uniquely real biological entities. In: Ayala FJ, Arp R (eds). *Contemporary debates in philosophy of biology*. Chichester, Wiley-Blackwell, pp 110-126.
- Moehring AJ (2011). Heterozygosity and its unexpected correlations with hybrid sterility. *Evolution* 65(9): 2621-2630.
- Moran NA, Munson MA, Baumann P, Ishikawa H (1993). A molecular clock in endosymbiotic bacteria is calibrated using the insect hosts. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 253(1337): 167-171.
- Moore WS (1977). An evaluation of a narrow hybrid zones in vertebrates. *The Quarterly Review of Biology*, 52: 263-277.
- Muller HJ (1940). Bearing of the Drosophila work on systematics. En: *The New Systematics* (Huxleys JS, ed.), pp. 185-268. Clarendon Press, Oxford.
- Muller HJ (1942). Isolating mechanisms, evolution and temperature. *Biol. Symp.*, 6: 71-125.
- Nadeau N (2014). Butterfly genomics sheds light on the process of hybrid speciation. *Molecular Ecology*, 23: 4441-4443.
- Narita S, Nomura M, Kato Y, Fukatsu T (2006). Genetic structure of sibling butterfly species affected by *Wolbachia* infection sweep: evolutionary and biogeographical implications. *Mol. Ecol.*, 15: 1095-1108.
- Narita S, Nomura M, Kageyama D (2007). Naturally occurring single and double infection with *Wolbachia* strains in the butterfly *Eurema hecabe*: transmission efficiencies and population density dynamics of each *Wolbachia* strain. *F.E.M.S. Microbiol. Ecol.*, 61: 235-245.
- NGRIP community members (2004). High-resolution record of Northern Hemisphere climate extending into the Last Interglacial period. *Nature*, 431: 147-151.
- Ortiz-Barrientos D, Greal A, Nosil P (2009). The genetics and ecology of reinforcement. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1168: 156-182.

- Papadopoulos AS, Baker WJ, Crayn D, Butlin RK, Kynast RG, Hutton I, Savolainen V (2011). Speciation with gene flow on Lord Howe Island. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108:13188-13193.
- Paterson HEH (1985). "The recognition concept of species". In: ES Vrba (ed.): Species and speciation. Transvaal Museum Monograph No. 4, Transvaal Museum, Pretoria: pp. 21-29.
- Perrot-Minnot MJ, Guo LR, Werren JH (1996). Single and double infections with *Wolbachia* in the parasitic wasp *Nasonia vitripennis*: effects on compatibility. *Genetics*, 143: 961-972.
- Posada D & Crandall KA (1998). Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, 14: 817-818.
- Presgraves DC (2010). The molecular evolutionary basis of species formation. *Nature Reviews Genetics*, 11: 175-180.
- Rasgon JL & Scott TW (2004). Phylogenetic characterization of *Wolbachia* symbionts infecting *Cimex lectularius* L. and *Oeciacus vicarius* Horvath (Hemiptera: Cimicidae). *Journal of Medical Entomology*, 41: 1175-1178.
- Rasgon JL & Scott TW (2003). *Wolbachia* and cytoplasmic incompatibility in the California *Culex pipiens* mosquito species complex: parameter estimates and infection dynamics in natural populations. *Genetics*, 165: 2029-2038.
- Raychoudhury R, Baldo L, Oliveira DCSG, Werren JH (2008). Modes of acquisition of *Wolbachia*: horizontal transfer, hybrid introgression, and codivergence in the *Nasonia* species complex. *Evolution*, 63: 165-183.
- Raychoudhury R, Grillenberger BK, Gadau J, Bijlsma R, van de Zande L, Werren JH, Beukeboom LW (2010). Phylogeography of *Nasonia vitripennis* (Hymenoptera) indicates a mitochondrial-*Wolbachia* sweep in North America. *Heredity*, 104: 318-326.

- R Development Core Team (2009). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.
- Reed KM & Werren JH (1995). Induction of paternal genome loss by the paternal-sex-ratio chromosome and cytoplasmic incompatibility bacteria (*Wolbachia*): a comparative study of early embryonic events. *Mol. Reprod. Dev.*, 40: 408-418.
- Reinhardt K, Kohler G, Schumacher J (1999). Females of the grasshopper *Chorthippus parallelus* (Zett.) do not remate for fresh sperm. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 266: 2003-2009.
- Reynolds WJ (1980). A re-examination of the characters separating *Chorthippus montanus* and *C. parallelus* (Orthoptera: Acrididae). *Journal of Natural History*, 14: 283-303.
- Ritchie MG, Butlin RK, Hewitt GM (1989). Assortative mating across a hybrid zone in *Chorthippus parallelus* (Orthoptera: Acrididae). *Journal of Evolutionary Biology*, 2: 339-352.
- Robinson R. (2006). Infection status drives interspecies mating choices in fruit fly females. *PLoS Biology*, 4(10), e345.
- Rolán-Alvarez E (2007). Sympatric speciation as a by-product of ecological adaptation in the Galician *Littorina saxatilis* hybrid zone. *Journal of Molluscan Studies*, 73: 1-10.
- Ronquist F & Huelsenbeck JP, (2003). MrBayes3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19: 1572-1574.
- Ros VI, Fleming VM, Feil EJ, Breeuwer JA (2009). How diverse is the genus *Wolbachia*? Multiple-gene sequencing reveals a putatively new *Wolbachia* supergroup recovered from spider mites (Acari: Tetranychidae). *Appl. Environ. Microbiol.*, 75: 1036-1043.

- Rubio JM (1992). Divergencia y especiación: marcadores cromosómicos y moleculares en el estudio de zonas híbridas entre dos subespecies de *Chorthippus parallelus*. Tesis doctoral, Universidad Autónoma de Madrid. Madrid, España.
- Sarasa J (2013). La zona híbrida pirenaica de *Chorthippus parallelus parallelus* y *Chorthippus parallelus erythropus* (Orthoptera). Tesis doctoral. Departamento de Biología, Universidad Autónoma de Madrid. Madrid, España.
- Sarasa J, Bernal A, Fernández-Calvín B, Bella JL (2013). *Wolbachia* induced cytogenetical effects as evidenced in *Chorthippus parallelus* (Orthoptera). *Cytogenet. Genome Res.*, 139: 36-43.
- Saridaki A & Bourtzis K (2010). *Wolbachia*: more than just a bug in insect's genitals. *Curr. Op. Microbiol.*, 13: 67-72.
- Savolainen V, Anstett MC, Lexer C, Hutton I, Clarkson JJ, Norup MV, Powell MP, Springate D, Salamin N, Baker WJ (2006). Sympatric speciation in palms on an oceanic island. *Nature*, 441: 210-213.
- Schilthuizen M, Giesbers MCWG, Beukeboom LW (2011). Haldane's rule in the 21st century. *Heredity*, 107: 95-102.
- Schilthuizen M & Lammers Y (2013). Hybrid zones, barrier *loci* and the 'rare allele phenomenon'. *J. Evol. Biol.* 26: 288-290.
- Searle, JB. 1986 ,Factors responsible for a karyotypic polymorphism in the common shrew *Sorex araneus*. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 229: 277-298.
- Serbus LR, Casper-Lindley C, Landmann F, Sullivan W (2008). The genetics and cell biology of *Wolbachia*-host interactions. *Annu. Rev. Genet.*, 42: 683-707.
- Serrano, L (1994) Zonas híbridas: el laboratorio natural de Portalet (Pirineo Oscense). Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid.
- Serrano L, García de la Vega C, Bella JL, López-Fernández C, Hewitt GM, Gosálvez J (1996), A hybrid zone between two subspecies of *Chorthippus parallelus*. X-chromosome variation through a contact zone. *Journal of Evolutionary Biology*, 9: 173-184.

- Servedio MR, Hermisson J, Van Doorn GS (2013). Hybridization may rarely promote speciation. *J. Evol. Biol.* 26: 282-285.
- Shuker DM, Underwood K, King TM, Butlin RK (2005). Patterns of male sterility in a grasshopper hybrid zone imply accumulation of hybrid incompatibilities without selection. *Proc. R. Soc. B*, 272: 2491-2497.
- Sinkins, S.P. 2004. *Wolbachia* and cytoplasmic incompatibility in mosquitoes. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 34: 723-729.
- Smith KL, Hale JM, Kearney MR, Austin JJ, Melville J (2013). Molecular patterns of introgression in a classic hybrid zone between the Australian tree frogs, *Litoria ewingii* and *L. paraewingii*: evidence of a tension zone. *Molecular Ecology*, :22: 1869-1883.
- Stackebrandt E, Frederiksen W, Garrity GM, Grimont PAD, Kämpfer P, Maiden, MCJ, Nesme X, Rosselló-Móra R, Swings J, Trüper HG, Vauterin L, Ward AC, Whitman WB (2002). Report of the *ad hoc* committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 52, 1043-1047.
- Stevens L (1989). Environmental factors affecting reproductive incompatibility in flour beetles, genus *Tribolium*. *J. Invertebr. Pathol.*, 53: 78-84.
- Stevens L & Wicklow DT (1992). Multispecies interactions affect cytoplasmic incompatibility in *Tribolium* flour beetles. *Am. Nat.*, 140: 642-653.
- Szymura JM, Lunt DH, Hewitt GM (1996). The sequence and structure of the meadow grasshopper (*Chorthippus parallelus*) mitochondrial 12s TRNA, ND2, COI, COII, ATPase 8 and tRNA genes. *Insect Molecular Biology*, 5: 127-139.
- Telschow A, Hammerstein P, Werren JH (2005a). The effects of *Wolbachia* versus genetic incompatibilities on reinforcement and speciation. *Evolution* 59: 1607-1619.

- Telschow A, Yamamura N, Werren JH (2005b). Bidirectional cytoplasmic incompatibility and the stable coexistence of two *Wolbachia* strains in parapatric host populations. *J. Theor. Biol.*, 235: 265-274.
- Telschow A, Flor M, Kobayashi Y, Hammerstein P, Werren JH (2007). *Wolbachia*-induced unidirectional cytoplasmic incompatibility and speciation: mainland-island model. *Plos One*, 2: e701.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG (1997). The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 24: 4876-4882.
- Toribio, R (2014). Localización cromosómica de secuencias de *Wolbachia* integradas en el genoma de *Chorthippus parallelus* (Orthoptera). Trabajo Fin de Máster. Máster en Genética y Biología Celular. Universidad Autónoma de Madrid.
- Tram U & Sullivan W (2002). Role of delayed nuclear envelope breakdown and mitosis in *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility. *Science* 296: 1124-1126.
- Turelli M (1994). Evolution of incompatibility-inducing microbes and their hosts. *Evolution*, 48 (5): 1500-1513.
- Turelli M, Hoffmann AA, McKechnie SW (1992). Dynamics of cytoplasmic incompatibility and mtDNA variation in natural *Drosophila simulans* populations. *Genetics*, 132: 713-723.
- Vala F, Egas M, Breeuwer JAJ, Sabelis MW (2004). *Wolbachia* affects oviposition and mating behaviour of its spider mite host. *Journal of Evolutionary Biology*, 17(3), 692-700.
- Vautrin E, Charles S, Genieys S, Vavre F (2007). Evolution and invasion dynamics of multiple infections with *Wolbachia* investigated using matrix based models. *J. Theor. Biol.* 245: 197-209.
- Vavre F, Fleury F, Varaldi J, Fouillet P, Bouletreau M (2000). Evidence for female mortality in *Wolbachia*-mediated cytoplasmic incompatibility in haplodiploid insects: epidemiologic and evolutionary consequences. *Evolution*, 54: 191-200.

- Vázquez P, Cooper SJ, Gosálvez J, Hewitt GM (1994). Nuclear DNA introgression across a Pyrenean hybrid zone between parapatric subspecies of the grasshopper *Chorthippus parallelus*. *Heredity*, 73: 436-443.
- Vines TH (2014). Stuck in the middle with you: close concordance between geographical clines in a cricket hybrid zone. *Molecular Ecology* 23: 1647-1649.
- Virdee SR (1991). Ecological and Genetic components of a Pyrenean hybrid zone in the meadow grasshopper *Chorthippus parallelus* (Orthoptera: Acrididae). PhD. Thesis, University of East Anglia.
- Virdee SR & Hewitt GM (1990). Ecological components of a hybrid zone in the grasshopper *Chorthippus parallelus* (Zetterstedt) (Orthoptera: Acrididae). *Bol San Veg Plagas*, 20: 299-309.
- Virdee SR & Hewitt GM (1992). "Postzygotic isolation and Haldane's rule in a grasshopper". *Heredity*, 69: 527-538.
- Virdee SR, Hewitt GM (1994). Clines for hybrid dysfunction in a grasshopper hybrid zone. *Evolution*, 48: 392-407.
- Wade M.J (2001). Evolution: Infectious speciation. *Nature* 409: 675-677.
- Wallace AR (1889). Darwinism: An Exposition of the Theory of Natural Selection with Some of Its Applications. Macmillan & Co. London, New York. Pp. 173-179.
- Weeks AR, Turelli M, Harcombe WR, Reynolds KT, Hoffmann AA (2007). From parasite to mutualist: rapid evolution of *Wolbachia* in natural populations of *Drosophila*. *PLoS Biol.*, 5: 997-1005.
- Wheeler QD & Meier R (2000). Species concepts and phylogenetic theory: a debate. Columbia University Press, New York.
- Wiesner KR, Loxdale HD, Köhler G, Schneider ARR, Tiedemann R, Weisser WW (2011). Patterns of local and regional genetic structuring in the meadow grasshopper, *Chorthippus parallelus* (Orthoptera: Acrididae), in Central Germany revealed using microsatellite markers. *Biological Journal of the Linnean Society*, 103: 875-890.

- Werren JH (1997). Biology of *Wolbachia*. *Annu. Rev. Entomol.*, 42: 587-609.
- Werren JH (1998). *Wolbachia* and speciation. En: Howard D, Berlocher L (eds). *Species and Speciation*. Oxford University Press: Oxford. pp 245-260.
- Werren JH, Baldo L, Clark ME (2008). *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. *Nat. Rev. Microbiol.*, 6: 741-751.
- Werren JH, Zhang W, Guo LR (1995). Evolution and phylogeny of *Wolbachia*: reproductive parasites of arthropods. *Proc. Biol. Sci.*, 261: 55-63.
- Wu CI (2001). The genic view of the process of speciation. *J. Evol. Biol.*, 14: 851-865.
- Wu CI & Davis AW (1993). Evolution of postmating reproductive isolation: the composite nature of Haldane's rule and its genetic bases. *Am. Nat.*, 142:187-212.
- Wu CI, Johnson NA, Palopoli MF (1996). Haldane's rule and its legacy: Why are there so many sterile males? *Trends Ecol. Evol.*, 11: 281-284.
- Wu CI & Ting C (2004). Genes and speciation. *Nature Reviews Genetics*, 5:114-122.
- Zabal-Aguirre M, Arroyo F, Bella JL (2010). Distribution of *Wolbachia* infection in *Chorthippus parallelus* populations within and beyond a Pyrenean hybrid zone. *Heredity* 104: 174-184.
- Zabal-Aguirre M, Arroyo F, García-Hurtado J, Torre J, Hewitt GM, Bella JL (2014). *Wolbachia* effects in natural populations of *Chorthippus parallelus* from the Pyrenean hybrid zone. *Journal of Evolutionary Biology*, 27(6), 1136-1148.
- Zhang Z, Schwartz S, Wagner L, Miller W (2000). A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J Comput Biol*, 7(1-2): 203-214.
- Zug R & Hammerstein P (2012) Still a host of hosts for *Wolbachia*: analysis of recent data suggests that 40% of terrestrial arthropod species are infected. *PLoS One*, 7: e38544.
- Zug R & Hammerstein P (2015). Bad guys turned nice? A critical assessment of *Wolbachia* mutualisms in arthropod hosts. *Biol. Rev.*, 90: 89-111.

ANEXO I

Anexo I. Frecuencias absolutas de infección

Población	Año	Sexo	Infección				Total
			O	B	F	BF	
Inglaterra	2002	M	6	0	0	0	6
		H	0	9	0	0	9
M. Central	2002	M	6	3	1	0	10
		H	-	-	-	-	-
Arudy	2003	M	29	10	12	2	53
		H	28	9	4	5	46
	2004	M	0	0	0	0	0
		H	0	0	0	0	0
	2005	M	34	3	3	8	48
		H	34	11	0	9	54
	2006	M	27	9	5	0	41
		H	32	21	0	6	59
Biescas	2004	M	4	1	12	6	23
		H	7	5	11	6	29
	2005	M	0	0	19	2	21
		H	0	1	10	12	23
	2006	M	4	2	10	15	31
		H	2	2	9	15	28
Sabiñánigo	2004	M	0	0	7	0	7
		H	0	0	15	0	15
	2006	M	0	0	18	0	18
		H	0	0	25	3	28
Navafría	2002	M	6	0	53	13	72
		H	7	3	17	5	32
	2003	M	3	1	24	6	34
		H	16	2	28	1	47
	2005	M	7	8	96	28	139
		H	3	20	85	38	146
Bubiión	2004	M	0	0	22	4	26
		H	2	0	25	0	27

Anexo I. Frecuencias absolutas de infección (continuación)

Población	Año	Sexo	Infección				Toltal
			O	B	F	BF	
Gabas	2002	M	36	4	10	1	51
		H	28	3	10	1	42
	2003	M	32	2	18	5	57
		H	37	7	8	0	52
	2005	M	37	2	5	6	50
		H	43	1	10	7	61
	2006	M	30	3	7	0	40
		H	41	1	8	1	51
L'Herminie	2005	M	21	9	3	18	51
		H	24	2	1	17	44
	2006	M	17	18	9	5	49
		H	16	15	5	7	43
Refugio	2005	M	27	3	3	12	45
		H	37	9	2	14	62
	2006	M	33	18	6	5	62
		H	28	8	7	1	44
Tourmont	2003	M	35	11	12	4	62
		H	49	12	3	2	66
	2005	M	35	4	2	4	45
		H	36	12	5	2	55
	2006	M	31	11	5	1	48
		H	27	20	0	1	48
C.L'Arille	2003	M	47	13	9	2	71
		H	37	4	7	1	49
	2005	M	44	3	0	5	52
		H	49	3	0	4	56
	2006	M	42	11	1	3	57
		H	46	11	0	0	57

Anexo I. Frecuencias absolutas de infección (continuación).

Población	Año	Sexo	Infección				Total
			O	B	F	BF	
Portalet	2002	M	33	6	4	3	46
		H	20	24	3	8	55
	2003	M	45	14	17	0	76
		H	35	7	8	5	55
	2004	M	34	9	5	2	50
		H	42	9	6	4	61
	2005	M	64	13	12	7	96
		H	44	6	5	11	66
	2006	M	62	28	6	0	96
		H	76	21	3	2	102
C. Mulas	2003	M	55	35	10	4	104
		H	27	29	4	4	64
	2005	M	25	4	7	22	58
		H	25	6	3	21	55
	2006	M	20	7	11	8	46
		H	30	13	1	11	55
Sallent de Gállego	2002	M	3	10	6	27	46
		H	1	9	5	25	40
	2003	M	0	12	1	43	56
		H	2	16	1	35	54
	2004	M	6	20	6	41	73
		H	3	22	3	32	60
	2005	M	0	9	1	39	49
		H	3	11	4	47	65
	2006	M	9	10	2	78	99
		H	1	26	1	67	95
Escarrilla	2002	M	11	3	29	6	49
		H	14	5	32	12	63
	2003	M	12	4	24	23	63
		H	6	2	25	8	41
	2005	M	13	3	15	22	53
		H	4	4	24	22	54
	2006	M	18	3	27	3	51
		H	16	2	12	12	42

ANEXO II

